

Entwicklung und Charakterisierung Strontium-modifizierter CaP-Knochenzemente zur Behandlung osteoporotischer Knochendefekte.

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades
Doktoringenieur (Dr.-Ing.)

Vorgelegt an der Fakultät Maschinenwesen
der Technischen Universität Dresden

von

Dipl.-Ing. Matthias Schumacher

geb. am 16. Februar 1981 in Amberg

Gutachter: Prof. Dr.-Ing. habil. Dr. h. c. Jürgen Eckert

Prof. Dr. rer. nat. Michael Gelinsky

Tag der Einreichung: 20. Mai 2014

Tag der Verteidigung: 23. Oktober 2014

Meinem Vater

Inhaltsverzeichnis

1	Motivation	1
2	Stand der Wissenschaft	5
2.1	Knochen und Osteoporose	5
2.1.1	Aufbau des Knochens	5
2.1.2	Knochenzellen und <i>Bone Remodelling</i>	6
2.1.3	Osteoporose	11
2.1.4	Therapieansätze zur Osteoporose	13
2.1.5	Strontium in der Osteoporosetherapie	15
2.2	Knochenersatzmaterialien	19
2.2.1	Calciumphosphate und Calciumphosphatzemente	21
2.2.2	Strontium-haltige Knochenzemente	26
3	Materialien und Methoden	31
3.1	Calciumphosphat-Knochenzement	31
3.1.1	Ausgangsmaterial (CPC)	31
3.1.2	Strontium-Modifikationen des CaP-Zements	31
3.1.3	Charakterisierung der Zementpasten	32
3.1.4	Probenherstellung	33
3.2	Materialcharakterisierung	34
3.2.1	Röntgendiffraktometrie (XRD)	34
3.2.2	Infrarotspektroskopie (FTIR)	34
3.2.3	Rasterelektronenmikroskopie und Elementanalyse (EDX)	34

3.2.4	Massenspektrometrie (ToF-SIMS)	34
3.2.5	Dichte, Porosität und Rauheit	35
3.2.6	Mechanische Charakterisierung	36
3.2.7	Ionenfreisetzung	37
3.2.8	Röntgendichte	38
3.3	Verwendete Zellen und Zellkulturbedingungen	39
3.3.1	Humane mesenchymale Stammzellen (hMSC)	39
3.3.2	Primäre humane Monozyten	39
3.4	Versuchsbedingungen	41
3.4.1	Einfluss von Sr^{2+} auf Osteogenese und Osteoklastogenese	41
3.4.2	Indirekte Zellkultur	42
3.4.3	Direkte Zellkultur	42
3.5	Biologische Analysemethoden	42
3.5.1	Biochemische und molekularbiologische Analysen der Osteogenese	42
3.5.2	Biochemische Analysen der Osteoklastogenese	47
3.6	Mikroskopische Untersuchungen	48
3.6.1	Fluoreszenzmikroskopie	49
3.6.2	Rasterelektronenmikroskopie (REM)	49
3.7	Statistik	50
4	Ergebnisse und Diskussion	51
4.1	Materialwissenschaftliche Charakterisierung der Zemente	51
4.1.1	Eigenschaften der Zementpasten und Abbindeverhalten	51
4.1.2	Zementierungsreaktion und Aushärten der Zemente	53
4.1.3	pH-Wert Entwicklung	58
4.1.4	Ionische Interaktionen mit wässrigen Medien	59
4.1.5	Charakterisierung von Oberfläche und Bulkmaterial	63
4.1.6	Mechanische Eigenschaften	67
4.1.7	Röntgendichte	71

4.2	Zellbiologische Untersuchungen zur Osteogenese	73
4.2.1	Wirkung von Sr^{2+} -Ionen aus SrCl_2 auf hMSC/Osteoblasten . . .	74
4.2.2	Indirekter Einfluss von SrCPC auf hMSC/Osteoblasten	76
4.2.3	Einfluss von SrCPC auf hMSC/Osteoblasten	78
4.3	<i>In vitro</i> -Charakterisierung der Osteoklastogenese	87
4.3.1	Wirkung von Sr^{2+} -Ionen auf Monozyten	88
4.3.2	Osteoklastogenese auf Sr-modifizierten Zementen	92
5	Ergebnisse weiterer Kooperationsstudien	99
6	Zusammenfassung	103
7	Literaturverzeichnis	111
8	Eigene Publikationen und Mitautorschaften	125
9	Danksagung	131
10	Selbstständigkeitserklärung	133
A	Anhang	135
A.1	Daten zur Materialcharakterisierung	135
A.2	Ergänzende Daten zur Charakterisierung <i>in vitro</i>	139

1 Motivation

Osteoporosis is a silent disease until it is complicated by fractures—fractures that can occur following minimal trauma. These fractures are common and place an enormous medical and personal burden on aging individuals and a major economic toll [...].

National Osteoporosis Foundation (USA), 2010 [1]

Die Osteoporose ist, zusammen mit der Arthrose, die mit Abstand häufigste systemische Skeletterkrankung: laut einer Studie aus dem Jahr 2003 sind in Deutschland rund 7,8 Mio. Patienten von Osteoporose betroffen. Auf Gewebe-Ebene ist ein Ungleichgewicht des im Knochen physiologisch ablaufenden, normalerweise ausbalancierten Ab- und Aufbaus von Knochensubstanz charakteristisch für die Osteoporose. Dies kann entweder durch eine erhöhte Aktivität resorbierender Zellen, der sog. Osteoklasten, oder eine verminderte Knochenneubildung durch Osteoblasten bedingt sein und führt zu einem fortschreitenden Verlust an Knochenmasse und -qualität. Daraus resultiert ein erhöhtes Frakturrisiko. Die Folgen der Osteoporose – Einschränkung der Mobilität mit Einbußen an Lebensqualität und selbstständiger Lebensführung – stellen weltweit ein enormes sozioökonomisches Problem dar [2–4].

Für die Osteoporosetherapie stehen, neben allgemeinen Maßnahmen zur Frakturvermeidung und der ggf. nötigen Einnahme von Calcium- und Vitamin D-Präparaten, eine Reihe, bei systemischer Gabe anti-resorptiv, also auf den physiologischen Knochenabbau drosselnd wirkende Therapeutika, zur Verfügung: Bisphosphonate, Strontiumranelat, ein Parathyroidhormon-Präparat, ein auf den Botenstoff RANKL wirkender Antikörper (Denosumab) sowie, für weiblichen Patienten, die Therapie mit Östrogen [5,6]. Insbesondere die duale Wirkung des Strontium-Ions (Sr^{2+}), pharmakologisch wirksamer Bestandteil des seit einigen Jahren verfügbaren Präparats *Strontiumranelat*,

verspricht eine effektive Therapie der systemischen Osteoporose: vielfach wurde unter Strontiumranelat-Gabe eine Zunahme der Knochenmasse und folglich eine Verringerung des Frakturrisikos nachgewiesen [7].

Rund 30 % aller Frakturen postmenopausaler Frauen und älterer Männer werden mit einem osteoporosebedingt geschwächten Knochen in Verbindung gebracht – Knochendefekte, deren klinische Versorgung häufig den Einsatz synthetischer Knochenersatzmaterialien erfordert [5]. Dies sind, neben zumeist metallischen Osteosynthese-Implantaten, häufig degradable Knochenzemente wie Calciumphosphat-Zemente und Calciumphosphat- oder Calciumsulfat-basierte Pulver oder Granulate. Jedoch existiert bislang noch kein für Osteoporosepatienten spezifisches Knochenersatzmaterial – die Versorgung akuter Knochendefekte erfolgt unter Verwendung „normaler“, d. h. für den Einsatz im Knochen mit gesundem Knochenstoffwechsel optimierter Materialien. In den meisten Fällen erfolgt parallel eine systemische Therapie mit Osteoporosemedikamenten, wodurch zwar ggf. eine Verbesserung des Knochenstatus insgesamt erreicht wird, lokal, d. h. am spezifischen Defekt, jedoch keine gezielte Wirksamkeit realisiert werden kann.

When once only surgical options were available to treat some diseases at their end-stage, there are now treatments based on new drugs and active substances, targeted at the early steps of these musculoskeletal diseases. A key issue in these treatments is to maximize the drug access to specific bone sites, and to be able to control the release of drugs, in order to maintain a desired drug concentration level for long periods of time without reaching a toxic level or dropping below the minimum effective level.

Ginebra *et al.*, 2006 [8]

In der Forschung wird dagegen mittlerweile der Ansatz verfolgt, durch speziell an die Erfordernisse des osteoporotischen Knochendefekts angepasste Knochenersatzmaterialien oder lokal applizierte, Wirkstoff-freisetzende Systeme den Knochenstoffwechsel am Defektort so zu beeinflussen, dass es zu einer beschleunigten Heilung kommt [9, 10]. So wurden unter anderem Systeme entwickelt, in denen Calciumphosphat-Knochenzemente (CPC) für die lokale Freisetzung therapeutisch wirksamer Strontium-Ionen

in einem spezifischen Knochendefekt genutzt werden. Allerdings basieren die bislang in der Literatur beschriebenen Zemente vorwiegend auf mit beträchtlichem Aufwand hergestellten, Sr-haltigen Calciumphosphatphasen, und die resultierenden Zemente besitzen häufig unzureichende mechanische Eigenschaften.

Ziel der vorliegenden Arbeit

Ausgehend von dieser Situation hatte die vorliegende Arbeit zum Ziel, Strontium-haltige Calciumphosphat-Knochenzemente zu entwickeln und zu charakterisieren, die durch kontrollierte Freisetzung von Sr^{2+} -Ionen *in vitro* wie auch *in vivo* den physiologischen Knochenaufbau (Osteogenese) unterstützen (siehe Abb. 1.1).

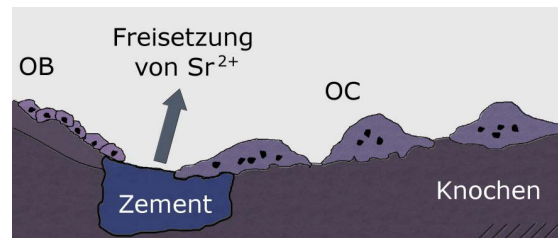


Abb. 1.1: Schematische Darstellung des Ansatzes zur lokalen Therapie osteoporotischer Knochendefekte: Freisetzung physiologisch wirksamer Sr^{2+} -Ionen aus einem Defekt-füllenden Knochenzement, die sowohl auf Knochen-bildende Osteoblasten (OB) als auch -resorbierende Osteoklasten (OC) wirken.

Weiterhin sollte mittels der freigesetzten Sr^{2+} -Ionen die Bildung von Knochen-resorbierenden Zellen (Osteoklastogenese) nicht verhindert werden, da diese eine wichtige Rolle in der natürlichen Regulation des Knochenstoffwechsels spielen. Jedoch sollte deren resorptive Aktivität möglichst gedrosselt werden. Die anhand dieser Maßgaben entwickelten Zemente sollten eine für den Einsatz im spongiösen Knochen ausreichende mechanische Festigkeit und eine gute Handhabbarkeit besitzen und nach Möglichkeit in ihrem Strontiumgehalt einfach einstellbar sein. Die Zemente sollten weiterhin *in vitro* auf ihren Einfluss auf osteogene (zur Differenzierung in Osteoblasten angeregte humane mesenchymale Stammzellen) und osteoklastogene (zur Osteoklasten-Bildung angeregte humane Monozyten) Zellen hin untersucht werden.

2 Stand der Wissenschaft

2.1 Knochen und Osteoporose

2.1.1 Aufbau des Knochens

Aus werkstoffwissenschaftlicher Sicht stellt Knochen ein Kompositmaterial aus rund 70 Gew.-% anorganischer Mineralphase und 30 Gew.-% organischen Bestandteilen dar. Die Mineralphase besteht zu gut 95 Gew.-% aus sog. Knochenapatit, der eine Calciumdefizitäre, Carbonat-haltige und mit zahlreichen Fremdionen substituierte Form des Hydroxylapatits (HA) darstellt. Mit einem Ca/P-Verhältnis von 1,37–1,87 (im Gegensatz zu stöchiometrischem HA mit $\text{Ca/P} = 1,67$) besitzt Knochenapatit eine höhere Löslichkeit als stöchiometrischer HA. Ein Teil der Ca^{2+} -Plätze im HA-Kristallgitter ist durch Fremdionen wie Natrium oder Kalium, PO_4^{3-} -Plätze durch CO_3^{2-} sowie H^- -Plätze durch Cl^- - und F^- -Ionen substituiert. Neben seiner wichtigen Rolle als struktureller Bestandteil des Körpers stellt der Knochen damit das größte Mineraldepot des Organismus dar und ist wichtiger Teil des metabolischen Systems, in dem ca. 99 % des Calciums und ca. 70 % des Phosphats gespeichert sind [11]. Ebenso spielt Knochen eine Rolle im Energiestoffwechsel des Körpers [12]. Die organische Phase setzt sich zu rund 95 Gew.-% aus dem Faserprotein Kollagen I und weiteren, nicht-kollagenen Proteinen wie Osteopontin (OP) und Osteocalcin (OCN) zusammen [13, 14].

Morphologisch ist Knochen ein hierarchisch aufgebautes Material: in Tripelhelices angeordnetes Tropokollagen bildet die sog. Kollagenfibrillen, welche sich zu Kollagen I-Fasern zusammenlagern. Von Apatitkristallen umlagert, stellen diese die unterste Organisationsebene des Knochens dar. Je nach Anordnung dieser mineralisierten Fasern wird zwischen *lamellarem Knochen*, bei dem sie in Schichten von 3–7 μm Dicke angeordnet sind, und *Geflechtknochen* unterschieden, in dem eine regellose Anordnung dominiert.

Letzterer findet sich vornehmlich als frühes Stadium der Knochenneubildung bzw. der Frakturheilung [13].

Durch konzentrische Anordnung lamellarer Schichten um einen zentralen Kanal (Havers'scher Kanal) entstehen die Osteone, ca. 250 μm dicke und bis zu 5 cm lange zylindrische Strukturen. Durch Zusammenlagerung zahlreicher Osteone, in deren Havers'schen Kanälen Nervenstränge und Blutgefäße verlaufen und die durch sog. Volkmann'sche Kanäle miteinander verbunden sind, bilden diese den kompakten Knochen, die sog. *Corticalis* (siehe Abb. 2.1).

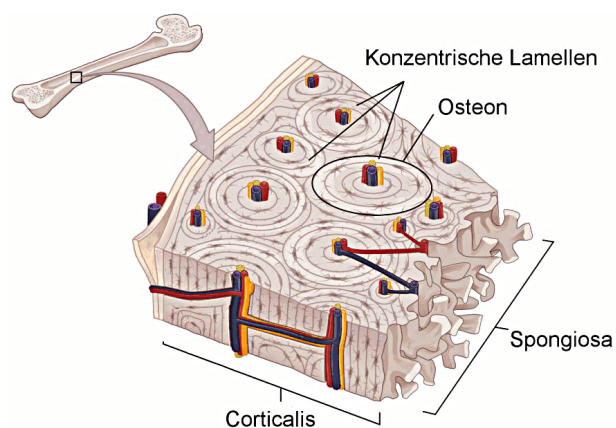


Abb. 2.1: Schematische Darstellung des Knochens. Verändert nach: OpenStax College. Anatomy & Physiology, Connexions Web site: <http://cnx.org/content/col11496/1.6/> am 19.06.2013.

Bevorzugt im Inneren bzw. in den metaphysären Bereichen langer Röhrenknochen findet sich eine zweite, rund 20 % der Knochenmasse ausmachende Erscheinungsform der Knochensubstanz, die *Spongiosa*. Sie besteht aus einem hoch porösen, interkonnektierenden Geflecht aus in lamellaren Schichten aufgebauten *Trabekeln*. In den Porenräumen der Spongiosa befindet sich das u. a. für die Blutbildung sowie als Quelle von Stammzellen wichtige Knochenmark [13, 14].

2.1.2 Knochenzellen und *Bone Remodelling*

Drei Zelltypen sind für das Knochengewebe charakteristisch: Knochen aufbauende *Osteoblasten*, das Gewebe resorbierende *Osteoklasten* sowie *Osteozyten*. Daneben finden sich zahlreiche andere Zellen im Knochengewebe, darunter Vorläufer der o. g. Zelltypen sowie die die Knochenoberfläche bedeckenden *bone lining cells* [14]. Zusammen

mit dem Kapillarsystem, welches den Knochen mit Sauerstoff und Nährstoffen versorgt, bilden diese Zellen die sog. *basic multicellular unit* (BMU), deren konzertiertes Zusammenspiel, das *bone remodelling*, den stetig ablaufenden Prozess des Knochenumbaus darstellt (Abb. 2.2). Der Remodellierungszyklus besteht aus der Aktivierung der Osteoklastogenese, der osteoklastären Resorption des Knochens, der anschließenden Proliferation und Differenzierung von Vorläuferzellen zu Osteoblasten, der Bildung neuer organischer Knochenmatrix durch Osteoblasten sowie der Mineralisierung dieses sog. Osteoids [15,16].

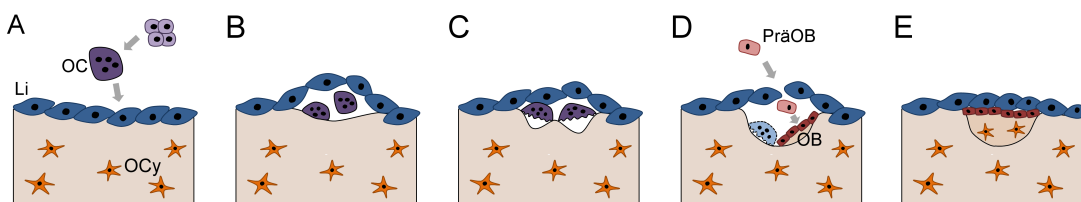


Abb. 2.2: Schematische Darstellung des *bone remodelling* durch die BMU: Aktivierung von Osteoklasten (OC) und Migration zur mit *lining cells* (Li) bedeckten Knochenoberfläche (A-B), Resorption (C), Migration von Prä-Osteoblasten (PräOB) und Differenzierung zu Osteoblasten (OB, D) sowie Matrixsynthese und Mineralisierung (E). Eingelagert im Knochen finden sich die Osteozyten (OCy). Nach: [16].

Osteoklasten

Osteoklasten sind im Knochen mit nur 2–3 Zellen/ μm^3 vergleichsweise seltene Zellen, die sich innerhalb der Havers'schen Kanäle sowie an der Knochenoberfläche befinden. Osteoklasten stammen aus der hämatopoetischen Stammzelllinie: sie entstehen durch Fusion einkerniger Monozyten zu mehrkernigen Vorläuferzellen. Die Entstehung von Osteoklasten wird auch als *Osteoklastogenese* bezeichnet [14]. Diese Differenzierung der Osteoklasten (Abb. 2.3) wird gesteuert durch von Osteoblasten, Stromazellen oder Lymphozyten sezernierten Faktoren wie den Interleukinen 1, 3, 6 und 11 oder dem *macrophage colony stimulating factor* (M-CSF). Letzterer regt monozytäre Osteoklasten-Vorläufer zur Koloniebildung und schließlich zur Fusion an. Weitere Faktoren, welche die Osteoklastogenese stimulieren sind u. a. Parathyroidhormon (PTH), Vitamin D₃ sowie insbesondere der *Receptor activator of Nuclear Factor κ B ligand* (RANKL), ein ebenfalls

von Osteoblasten gebildeter Regulator der Osteoklastogenese und Osteoklastenaktivität [15,17,18].

Reife, zur Resorption fähige Osteoklasten sind 20–80 µm große Zellen mit 3–25 Zellkernen. Unter dem Einfluss von RANKL kommt es zur Adhäsion der Zellen an die Knochenoberfläche und zur Polarisierung der Zellen: an ihrer Unterseite wird der sog. Bürstensaum (*ruffled border*) ausgebildet. Diese aufgefaltete Basalmembran ermöglicht eine große Kontaktfläche zum darunter liegenden Knochen. Darum schließt sich eine mit Aktinfilamenten durchzogene, ringförmige Struktur, der sog. *Aktinring*. Hier bildet sich die *sealing zone* aus: durch speziell an Knochenproteine bindende Integrine entsteht eine äußerst dichte Anbindung an die Knochenoberfläche und damit ein abgeschlossener Resorptionsraum. Über im Bürstensaum vorhandene Protonenpumpen werden H⁺-Ionen in den Resorptionsraum gepumpt, die dort, zusammen mit ebenfalls vom Osteoklasten sezernierten proteolytischen Enzymen wie der Tartrat-resistenten sauren Phosphatase (TRAP) und Cathepsin K, die anorganische bzw. organische Knochenmatrix abbauen. Calcium, Phosphat und Abbauprodukte der Knochenproteine werden durch die Basalmembran aufgenommen, teilweise intrazellulär weiter abgebaut (intrazelluläre TRAP) und schließlich in die Umgebung abtransportiert [15,19].

Osteoblasten

Osteoblasten stammen aus der über ein hohes Proliferationspotential verfügenden mesenchymalen Stammzelllinie, welche nicht nur in osteoblastäre, sondern bei entsprechender Stimulation auch in z. B. adipogene, fibröse oder chondrogene Richtung differenzieren kann. Unter Einfluss verschiedener Cytokine wie dem *transforming growth factor* β (TGFβ) oder *bone morphogenic proteins* (BMPs) differenzieren diese zunächst in Vorläuferzellen, sog. Prä-Osteoblasten (siehe Abb. 2.3), die sich an der Oberfläche des Knochens sowie im Knochenmark befinden. Später, als *reife* Osteoblasten, besitzen die Zellen eine kuboidale bis flächige Morphologie und finden sich in Bereichen der Knochenneubildung (*Osteogenese*) an der Knochenoberfläche. Dort synthetisieren sie Kollagen Typ I, nicht-kollagene Proteine wie Osteocalcin, Sialoprotein, Osteopontin, Osteoprotegerin sowie diverse Proteoglykane und bauen so die organische Knochenmatrix auf. Diese knochenspezifische extrazelluläre Matrix (ECM) wird auch als *Osteoid* bezeichnet. Weiterhin wird die zelluläre Mineralisation des Osteoids durch das von

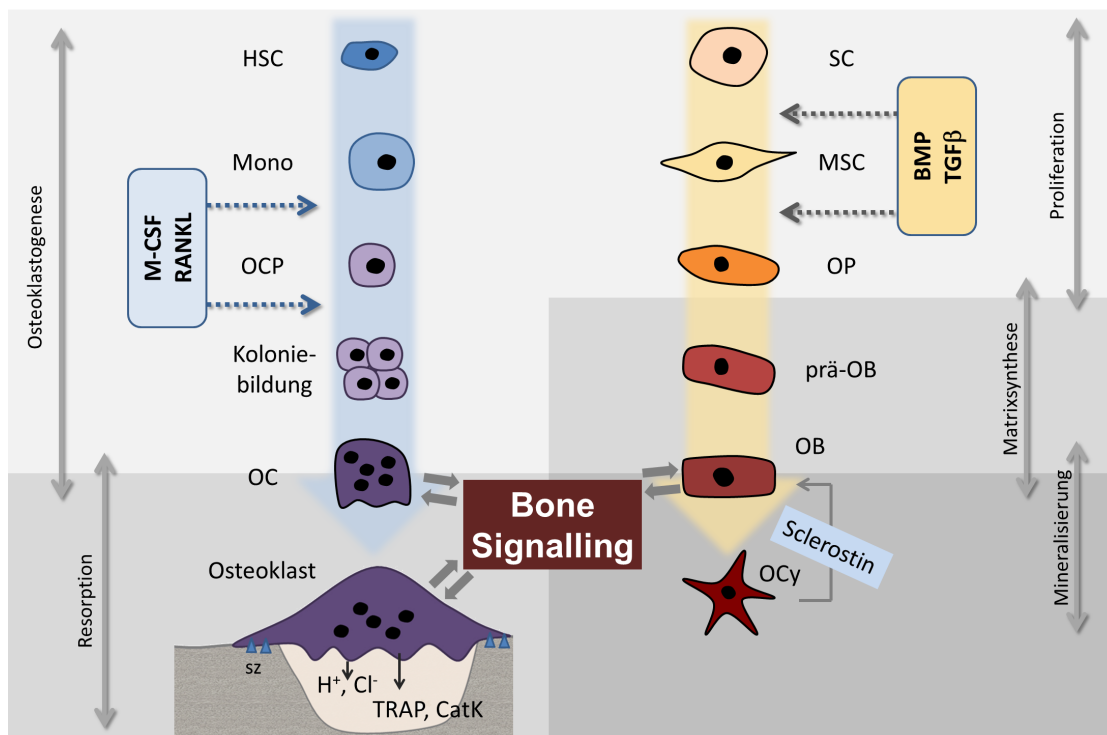


Abb. 2.3: Schematische Darstellung der Differenzierung von Zellen der BMU. **Osteoklasten:** von hämatopoetischen Stammzellen (HSC) abstammende Monozyten (Mono) werden durch die Wirkung von M-CSF zu Prä-Osteoklasten (OCP) und bilden schließlich Kolonien, aus denen unter Einfluss von RANKL mehrkernige, resorbierende Osteoklasten (OC) fusionieren. **Osteoblasten:** Aktivierung von Stammzellen (SC) zu mesenchymalen Stammzellen (MSC), über Osteoprogenitorzellen (OP) zu Prä-Osteoblasten (prä-OB) und Osteoblasten bis hin zu Osteozyten (OCy). Nach: [15, 17, 19].

Osteoblasten produzierte Enzym *alkalische Phosphatase* (ALP) gesteuert. Die Aktivität der ALP wird entsprechend auch als früher Marker der osteoblastären Differenzierung herangezogen. Keimbildung und Kristallwachstum des Knochenminerals können sowohl homogen, aus übersättigter Lösung in sog. Matrixvesikeln, als auch inhomogen ablaufen, wobei von Osteoblasten synthetisierte Proteine wie Osteocalcin als Keimbildner wirken [13, 14, 17].

Die Differenzierung zu Osteoblasten wird neben den Wachstumsfaktoren BMP, TGFβ und dem *fibroblast growth factor* (FGF) auch von der Ca^{2+} - und Phosphat-Konzentration reguliert, wobei beide auch durch aktive zelluläre Prozesse beeinflusst werden [17, 20]. So haben sich für Proliferation und osteogene Differenzierung von mesenchymalen

Stammzellen Konzentrationen von $[Ca^{2+}] = 1,8 \text{ mM}$ und $[Phosphat] = 0,9 \text{ mM}$ als optimal erwiesen [21]. Zentraler Rezeptor für Ca^{2+} ist der *calcium sensing receptor* (CaSR), der in der Zellmembran osteoblastärer Zellen nachgewiesen wurde und sowohl an der Regulation der Proliferation als auch der Differenzierung beteiligt ist [20,22]. Aber auch andere Strukturen wie Calcium-Kanäle der Zellmembran (insbesondere der *type L voltage-gated calcium channel*) sind gegenüber Änderungen der Ca-Konzentration empfindlich und an der Regulierung z. B. der BMP-Expression durch Osteoblasten beteiligt [23]. Die der zellulären Reaktion auf Phosphat zugrunde liegenden Signalwege sind bislang nicht eindeutig geklärt, jedoch wurde gezeigt, dass zahlreiche Zelltypen, darunter auch Osteoblasten, sensitiv gegenüber Schwankungen der Phosphat-Konzentration sind und diese sowohl Proliferation als auch Differenzierung beeinflussen können [24,25].

Osteozyten

Durch anhaltende Produktion extrazellulärer Matrix und deren Mineralisierung werden Osteoblasten schließlich vollständig von mineralisiertem Osteoid umschlossen und wandeln sich zu *Osteozyten* (OCy, vgl. Abb. 2.3). Osteozyten bilden dendritische Fortsätze aus, über die sie durch ein Netzwerk von Kanälen (*canaliculi*) untereinander sowie mit der Knochenoberfläche verbunden sind. Osteozyten wird eine wichtige Rolle in der Regulation des Knochenstoffwechsels und im *bone signalling* zugeschrieben, insbesondere durch die Aktivierung bzw. Inhibierung von Osteoklasten durch RANKL und Osteoprotegerin. Zudem besitzen Osteozyten die Fähigkeit, die Mineralisierung innerhalb der Kanäle, durch die sie miteinander verbunden sind, zu regulieren. Vermutlich besitzen sie weiterhin Mechanorezeptoren und sind somit regulatorisch am *Modelling*, also dem lastangepassten Umbau der Knochengeometrie, beteiligt [14,26].

Bone signalling

Als *bone signalling* wird die gegenseitige Regulierung der im Knochen vorhandenen Zellen bzw. der Zellen der BMU bezeichnet (vgl. Abb. 2.3). So exprimieren Osteoblasten eine Reihe von Cytokinen, die wichtige Signalstoffe der Osteoklastogenese darstellen. Darunter sind u. a. der *macrophage colony stimulating factor* (M-CSF) und der *receptor activator of nuclear factor κ_B -ligand* (RANKL), welche die Differenzierung und Aktivität von Osteoklasten regulieren. Weiterhin werden Botenstoffe wie BMPs, TGF β und *insuline-*

like growth factors (IGFs) von Osteoblasten exprimiert [17]. Als Inhibitor der Resorption wirkt das von Osteoblasten produzierte *Osteoprotegerin* (OPG): als *decoy receptor* verhindert es die Bindung von RANKL an die entsprechenden Rezeptoren der Osteoklasten (RANK) und blockiert so dessen Aktivierung. Umgekehrt wird von Osteoklasten das membrangebundene *Ephrin B2* exprimiert, welches bei Kontakt mit dem osteoblastären Rezeptor *Ephrin B4* sowohl die osteogene Differenzierung als auch die Matrixsynthese und -mineralisierung stimuliert. Ebenso setzt die osteoklastäre Resorption Ca^{2+} -Ionen und Phosphat frei, welche einerseits die Aktivität der Osteoklasten selbst, andererseits aber auch Differenzierung und Aktivität der Osteoblasten beeinflussen. Schließlich gibt es weitere regulatorische Beziehungen zwischen Osteozyten und Osteoblasten: so wird beispielsweise auch mittels des von Osteozyten gebildeten *Sclerostins* die Osteogenese reguliert [15, 17, 27].

2.1.3 Osteoporose

Osteoporose ist eine systemische Skeletterkrankung, die durch eine verringerte Knochenmasse und eine Schädigung der Knochen(mikro)architektur charakterisiert ist, wodurch es zu einer verminderten Festigkeit des Knochens und folglich einem erhöhten Frakturrisiko kommt [2]. Mit ca. 7,8 Mio. Betroffenen in Deutschland (2003) und geschätzt über 200 Mio. Fällen weltweit ist die Osteoporose eine der häufigsten chronischen Erkrankungen und stellt ein enormes soziales und ökonomisches Problem dar [3]. Zu unterscheiden sind die sowohl post-menopausal als auch bei jüngeren, von Östrogenmangel betroffenen Frauen auftretende sog. *primäre Osteoporose* sowie die bei Frauen und Männern nach dem 75. Lebensjahr gleichermaßen bekannte sog. *sekundäre Osteoporose* (senile Osteoporose) [28]. Osteoporose wird häufig als Reduzierung der Knochendichte (*bone mass density*, BMD) um ein 2,5-faches der Varianz in der BMD knochengesunder Referenzpatienten definiert und mit Hilfe der Knochendichtemessung (Dual-Röntgen-Absorptiometrie, DXA) diagnostiziert. Klinisch wird die Osteoporose dagegen zumeist erst durch das Auftreten von Knochenbrüchen, insbesondere sog. Kompressionsfrakturen der Wirbelkörper sowie Femur- und Radiusfrakturen, erkannt [29]. Trotz des unbestrittenen Zusammenhangs von reduzierter BMD und erhöhtem Frakturrisiko werden mittlerweile verstärkt diagnostische Verfahren entwickelt, die neben der BMD

auch biochemische Marker des *bone turnover*, bereits aufgetretene Frakturen sowie eine Reihe weiterer Faktoren berücksichtigen [1].

Die Ursache der Osteoporose ist bis heute unklar, wobei sowohl genetische Prädisposition als auch chronische Erkrankungen und Faktoren wie Ernährung und mangelnde körperliche Aktivität als Einflussfaktoren aufgeführt werden [30,31]. Verantwortlich für die osteoporotische Veränderung des Knochengewebes ist ein gestörtes Verhältnis zwischen zellulärem Knochenaufbau durch Osteoblasten und osteoklastärer Resorption, wobei insgesamt Knochensubstanz verloren geht. Dabei kommt es sowohl zum Verlust kortikalen Knochens als auch, wie in Abbildung 2.4 zu erkennen, zur Abnahme der Trabekeldichte und -qualität im spongiösen Knochen.

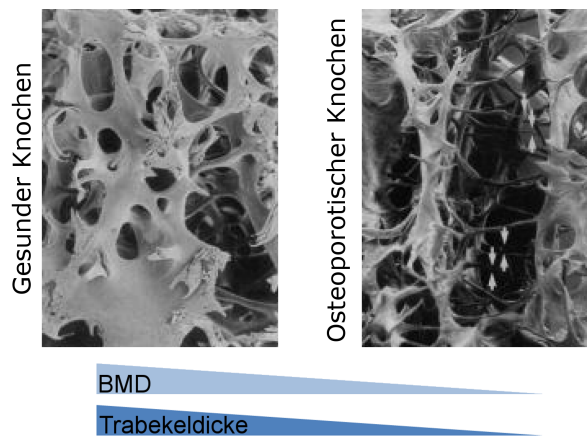


Abb. 2.4: Vergleich von gesunder und osteoporotischer Spongiosa: Durch den fortschreitenden Verlust an Knochenmasse (Verringerung der BMD) kommt es zur Abnahme der Trabekeldicke im spongiösen Knochen. Nach: [11].

Bei der primären Osteoporose beruht dieses Ungleichgewicht auf zellulärer Ebene auf einem infolge des Östrogenmangels veränderten *bone signalling*: Die Konzentrationen mehrerer regulatorischer Interleukine wie IL-1 und IL-6 sowie insbesondere M-CSF sind stark erhöht, was zu einer Stimulation der Osteoklastogenese und der osteoklastären Resorption führt (vgl. Kap. 2.1.1). Dagegen ist im Fall der sekundären Osteoporose häufig die Anzahl und Aktivität der Osteoblasten, nicht jedoch die der Osteoklasten deutlich reduziert – ein generell mit fortschreitendem Alter auftretendes Phänomen, das häufig durch andere Erkrankungen sowie eine abnehmende Mobilität verstärkt wird [15].

2.1.4 Therapieansätze zur Osteoporose

Grundsätzlich stehen in der Osteoporosetherapie zwei Ansätze zur Verfügung: einerseits kann mit Hilfe *antiresorptiv* wirkender Präparate eine weitere Abnahme der Knochenmasse verhindert und der (verminderte) Status „eingefroren“ werden, andererseits lässt sich mit Hilfe *osteoanabler* Wirkstoffe die Knochenneubildung anregen (vgl. Abb. 2.5). Häufig werden beide Strategien parallel oder aufeinander aufbauend verfolgt.

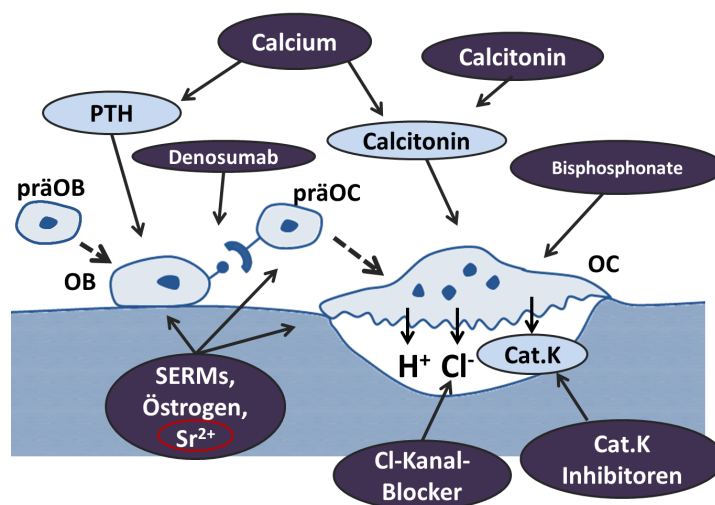


Abb. 2.5: Angriffspunkte verschiedener systemischer Osteoporose-Therapien: auf Osteoklasten (OC) bzw. deren Vorläufer (präOC) wirkende, anti-resorptive sowie osteoanabole, d. h. auf Osteoblasten (OB) oder deren Vorläufer (präOB) stimulierend wirkende Substanzen. Wirkstoffe: dunkelblau, Angriffspunkte: hellblau. Nach: [32].

Resorptionshemmende Therapien

Die häufigste Klasse resorptionshemmender Präparate stellen derzeit **Bisphosphonate** dar. Ihre Wirkung beruht auf der, mehr oder weniger spezifischen, Hemmung des Osteoklasten-spezifischen Enzyms *Farnesyl-Pyrophosphat-Synthase*, welches wiederum für die Bildung von für die Resorption essentieller Proteine verantwortlich ist. Entsprechend wird durch die Gabe von Bisphosphonaten die osteoklastäre Resorption direkt gehemmt. Aufgrund ihrer hohen Bindungsaffinität zu Calciumphosphaten werden Bisphosphonate im Knochen angereichert, weshalb ihre Wirkung lange anhält. Allerdings kommt es durch Bisphosphonate auch zur Apoptose von Osteoklasten, wodurch das

zelluläre Signalling zwischen OC und OB zum Erliegen kommt und die Knochenneubildung beeinträchtigt wird. Zudem traten während der Langzeittherapie mit einigen Bisphosphonaten Kiefernekrosen auf [9,33].

Cathepsin K, ein für den osteoklastären Abbau organischer Knochenbestandteile entscheidendes Enzym, kann durch synthetische **Cathepsin K-Inhibitoren** gehemmt werden. Dadurch wird zwar die Resorption verlangsamt, nicht jedoch die Vitalität der OC beeinträchtigt. Vorteil dieser Wirkstoffklasse ist somit ein (weitgehend) intaktes Signalling zwischen OC und OB [9,34].

RANKL, ein wichtiges Signalmolekül in der Kommunikation von OB und OC und stimulierender Faktor während der Osteoklastogenese, kann vergleichbar der Wirkung seines natürlichen Antagonisten Osteoprotegerin (OPG) auch mit Hilfe **monoklonaler Antikörper (Denosumab)** gebunden werden, wodurch die Bildung resorbierender Osteoklasten gehemmt wird. Auch hier bleiben die für das Signalling wichtigen Zellen weitgehend erhalten. Bei Behandlung mit RANKL-Antikörpern wird die zum Beginn der Behandlung vorhandene Knochenmasse konserviert bzw. durch die anhaltende Osteoblastenaktivität sogar wieder gesteigert [35].

Selektive **Östrogenrezeptormodulatoren** (SERMs) interagieren wie natürliche Östrogene mit spezifischen Rezeptoren (ER α und ER β) der Osteoklasten und wirken hemmend auf deren Aktivität, wodurch es zu einem Anstieg der BMD kommt [36]. Vergleichbar wirkt **Calcitonin**, das als natürlicher Antagonist des Parathormons bei erhöhten (Plasma-) Calcium-Konzentrationen in der Schilddrüse produziert wird und aktivitätshemmend auf Osteoklasten wirkt [9].

Strontium-Ionen zeigen eine sowohl resorptionshemmende als auch die Knochenneubildung stimulierende Wirkung und werden in Form des Wirkstoffs *Strontiumranelat* klinisch eingesetzt [37]. Dieses „duale Wirkprinzip“ wird im folgenden Abschnitt (Kap. 2.1.5) näher betrachtet.

Osteoanabole Wirkstoffe

Derzeit wird neben Strontiumpräparaten (Kap. 2.1.5) ausschließlich **Parathormon** (PTH) bzw. ein Fragment dessen (PTH 1-34) als rein osteoanaboler Wirkstoff klinisch eingesetzt. PTH wird normalerweise in Folge niedriger (Plasma-) Calcium-Level von der Nebenschilddrüse freigesetzt und wirkt stimulierend sowohl auf die osteoblastäre Aktivität

als auch die Reifung von Osteoklasten. Obwohl also auch die Resorption des Knochens durch PTH stimuliert wird, überwiegt bei intermittierender Gabe der osteoanabole Effekt und es kommt zu einem Anstieg der BMD und einem verringerten Frakturrisiko. Allerdings wurde die maximale Anwendungsdauer auf 2 Jahre begrenzt, da in Langzeit-Versuchen in Rattenmodellen Osteosarkome beobachtet wurden. Zuletzt wurde auch mit PTH-ähnlichen Peptiden, sog. *PTHrP* (PTH-related protein), eine vergleichbare Wirkung erzielt [9,38].

Ein weiterer Ansatz, der zur Zeit im Rahmen klinischer Studien getestet wird, basiert auf der Ausschaltung eines natürlichen Regulationsmechanismus: *Sclerostin*, ein von Osteozyten und Osteoklastenvorläufern gebildeter Wnt-Antagonist, mindert die osteoblastäre Knochenneubildung durch kompetitive Hemmung der (LRP)5/6-Rezeptoren. Mittels monoklonaler **anti-Sclerostin Antikörper** kann dieser Regulationsweg ausgeschaltet und somit eine Steigerung der BMD erreicht werden [9, 39]. Aufgrund der ähnlichen Wirkung auf den Wnt-Signalweg wurden auch *anti-Dickkopf-1* (antiDKK1)-Antikörper entwickelt, jedoch mit teils widersprüchlichen Ergebnissen [39].

2.1.5 Strontium in der Osteoporosetherapie

Strontium stellt mit rund 0,03 % Anteil an der Erdkruste ein vergleichsweise häufiges, jedoch für den menschlichen Organismus nicht essentielles Element dar. Bei normaler Ernährung wird in westlichen Ländern eine Strontiumaufnahme von ca. 2–4 mg/Tag angenommen. Strontium folgt im Körper denselben metabolischen Wegen wie Calcium und wird an Ca-Plätzen in den Knochenapatit eingebaut. Entsprechend dem Vorkommen in der Erdkruste substituieren Sr^{2+} rund 0,035 % der Ca-Ionen im Knochen. Toxische Wirkungen erhöhter Sr-Konzentrationen in der Nahrung sind nicht beschrieben [40–42].

Strontium-Ionen (Sr^{2+}) besitzen einen dem Ca^{2+} -Ion ähnlichen Ionenradius¹ sowie die selbe Ladung, weshalb Sr^{2+} -Ionen in vielen biologischen Prozessen eine zwar vergleichbare, jedoch schwächer ausgeprägte Wirkung als Ca^{2+} -Ionen zeigen [41].

¹ Ca^{2+} -Ionen besitzt im hexagonalen Hydroxylapatit einen theoretischen Ionenradius von 148 pm, Strontium (auf gleicher Position) von 158 pm [43].

1951 wurde von Shorr und Carter erstmals eine gesteigerte Knochenbildung (Calcium-Adsorption) unter dem Einfluss von Strontiumlactat ($C_6H_{10}O_6Sr \cdot xH_2O$) beschrieben [44], weshalb dieses bereits 1959 in einer Pilotstudie zur systemischen Osteoporosetherapie eingesetzt wurde. Erst Mitte der 1990er Jahre wurde der „Knochengewebe konservierende“ Effekt von Strontium systematisch *in vivo* untersucht, wobei gezeigt werden konnte, dass die regelmäßige Gabe von zweiwertigem Strontium den Östrogen-Mangel-bedingten Verlust an Knochenmasse in ovariectomierten (OVX) Ratten verminderte [45]. Schließlich wurden in zwei klinischen Phase III-Studien eine durch die Gabe von 2 g/Tag *S-12911* (später *Strontiumranelat*) signifikante Zunahme der Knochendichte sowie eine Abnahme Osteoporose-assoziiierter vertebraler und nicht-vertebraler Frakturen gezeigt [46,47]. Pharmazeutisch wirksamer Bestandteil des Strontiumranelats sind dabei die beiden zweiwertigen Sr-Ionen, welche zunächst mit Ranelin-Säure komplexiert sind, in wässriger Umgebung jedoch als freie Ionen vorliegen (Abb. 2.6).

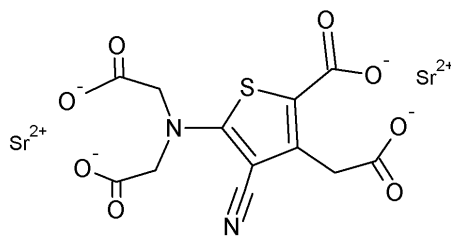


Abb. 2.6: Strukturformel von Strontiumranelat. Nach: [40].

Im Jahr 2004 wurde Strontiumranelat unter den Handelsnamen Protelos® bzw. Osseor® von der Firma Servier Deutschland GmbH zunächst zur Therapie von Frauen mit postmenopausaler Osteoporose für den europäischen Markt zugelassen. Seit 2012 ist eine Anwendung auch für Männer mit fortgeschrittener Osteoporose vorgesehen. Aufgrund einer 2013 veröffentlichten Studie, in der ein erhöhtes Risiko von Myokardinfarkten mit der regelmäßigen Einnahme von Protelos® assoziiert wurde (1,7 % versus 1,1 % für Placebo) wird Sr-Ranelat derzeit nur noch zur Behandlung der „schweren Osteoporose bei postmenopausalen Frauen mit hohem Frakturrisiko zur Reduktion des Risikos von

Wirbelsäulen- und Hüftfrakturen“ sowie der „schweren Osteoporose bei erwachsenen Männern mit erhöhtem Frakturrisiko“ empfohlen².

Wirkung des Strontiums auf zellulärer Ebene

In zahlreichen *in vivo*-Studien wurde eine Zunahme der trabekulären Knochenmasse durch die resorptionshemmende sowie die Knochenneubildung stimulierende Wirkung von Strontium phänomenologisch gezeigt. Auf zellulärer Ebene zeigen z. B. Canalis et al. eine Steigerung der Proliferation osteoblastärer Precursorzellen (aus der Ratte) sowie eine Zunahme der Expression kollagener Matrixproteine unter dem Einfluss von 10^{-3} M Strontiumranelat [48]. Anhand primärer *muriner* Osteoblasten wurde später eine dosisabhängige Wirkung des Strontiums auf die Aktivität osteoblastärer Zellen beschrieben: im Bereich von 2–5 $\mu\text{g/ml}$ Sr^{2+} wurde eine gesteigerte *bone nodule*-Bildung beobachtet, während die Mineralbildung bei erhöhter (20–100 $\mu\text{g/ml}$) Konzentration gehemmt wurde [49].

Der genaue Wirkmechanismus von Sr^{2+} -Ionen auf Zellen der osteoblastären Linie sowie auf Osteoklasten bzw. deren Vorläuferzellen ist derzeit noch nicht vollständig aufgeklärt, jedoch existieren Studien, die einzelne mögliche Angriffspunkte des Strontiums beschreiben (Abb. 2.7). So wurde *in vivo* eine durch Strontium erhöhte β -Catenin-Expression gemessen, was auf eine Verstärkung von Transkriptionsfaktoren der Osteogenese hindeutet. Darüber hinaus wurde auch ein indirekter Einfluss durch eine Verminderung der Expression von Inhibitoren des Wnt-Signalwegs vorgeschlagen [50]. Ebenfalls stimulierend auf die Proliferation und Differenzierung osteoblastärer Vorläuferzellen wirkt Strontium über eine Steigerung der Prostaglandin-Expression [51]. Auch der in Zellen der osteoblastären Linie zu findende *calcium sensing receptor* (CaSR) stellt einen möglichen Angriffspunkt dar: Dem durch Ca^{2+} aktivierbaren CaSR wird eine Rolle bei der Regulierung der osteogenen Differenzierung sowie der Osteoblastenaktivität zugeschrieben [52]. Studien von Chattopadhyay et al. zeigen, dass eine Aktivierung des CaSR durch Sr^{2+} möglich ist und dies zum anabolen Effekt von Sr^{2+} -Ionen beiträgt [53].

²Quelle: Rote-Hand-Brief über neue Kontraindikationen für Strontiumranelat (Protelos), abgerufen am 05.12.2013 von WebSite der Arzneimittelkommission der deutschen Ärzteschaft (AkdÄ), www.akdae.de/Arzneimittelsicherheit/RHB/20130513.pdf

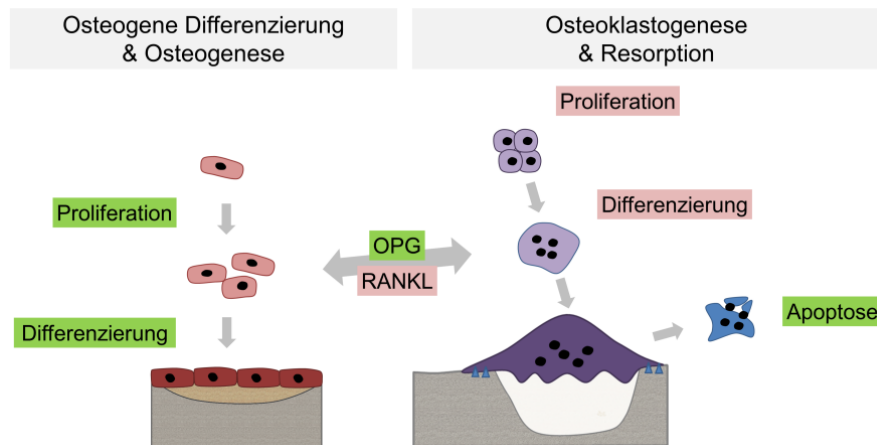


Abb. 2.7: Dualer Effekt von Strontium auf Knochenzellen: Stimulierende Wirkung auf die Osteogenese (grün) und Inhibierung der osteoklastären Resorption (rot). Nach: [37].

Vergleichbare Mechanismen scheinen der inhibierenden Wirkung des Strontiums auf Osteoklasten zugrunde zu liegen. Auch für osteoklastäre Zellen wurde eine Aktivierung des ebenfalls von Osteoklasten exprimierten CaSR durch Sr^{2+} nachgewiesen, wobei Strontium in diesem Fall die Apoptose-induzierende Wirkung des Calciums begünstigt [54].

Die Wirkung des Strontiums beruht weiterhin auf der Beeinflussung der parakri-
nen Signalwege zwischen Osteozyten und Osteoblasten bzw. Osteoklasten: Bakker *et al.* beschreiben, dass die stimulierende Wirkung von zuvor durch Inkubation mit mechanisch angeregten Osteozyten konditioniertem Medium auf die Osteoklastogenese durch Zugabe von 3 mM Strontiumranelat deutlich reduziert wird [55]. Ein direkter Nachweis des Einflusses von Sr^{2+} gelang ebenfalls anhand konditionierter Medien: unter Einfluss von 0–3 mM zeigten *murine* MC3T3-E1 Osteoblasten eine dosisabhängig abnehmende Expression der für RANKL codierenden mRNA sowie eine abnehmende Produktion von Osteoprotegerin (OPG). Entsprechende Zellkultur-Überstände führten in Osteoklastenkulturen zu einer Abnahme der TRAP-Aktivität sowie der resorptiven Aktivität, wobei durch Ausschaltung dieses Effekts mittels Anti-RANKL-Antikörpern die RANKL-Expression als Ursache bestätigt werden konnte [56].

2.2 Knochenersatzmaterialien

Als Knochenersatzmaterialien werden Materialien biologischen oder synthetischen Ursprungs bezeichnet, die zur Rekonstruktion knöcherner Defekte verwendet werden können. Hieraus ergeben sich folgende Anforderungen: Es muss *biokompatibel* sein, aus einer *osteokonduktiven Matrix* bestehen und ggf. *osteoinduktive Faktoren* enthalten. Ferner sollte es mit dem zu ersetzenden Gewebe vergleichbare *mechanische Eigenschaften* besitzen [14,57]. Für den Begriff der Biokompatibilität finden sich in der Literatur zahlreiche Definitionen, die sich zumeist auf die nicht-toxische Wirkung eines Materials beziehen. Die zumeist gebrauchten Definitionen lassen sich wie folgt zusammenfassen [14,58]:

Setzt ein Biomaterial zwar potentiell schädliche Substanzen oder Abbauprodukte frei, jedoch in nicht-toxischen Konzentrationen, oder kommt es anderweitig zu lediglich leichten Abwehrreaktionen, kann ein Material als *biokompatibel* gelten.

Kommt es nicht zur Ausbildung eines festen Interfaces zum direkt angrenzenden Gewebe, jedoch auch nicht zur Freisetzung toxischer Bestandteile aus dem Material, wird von *bioinertem* Verhalten gesprochen. Kommt es im Bereich solcher bioinertter Materialien zu einer mechanischen Stimulation des Gewebes, wird häufig eine fibröse Kapsel um das körperfremde Material gebildet.

Positive Wechselwirkungen zwischen Gewebe und Material, insbesondere die Ausbildung eines festen Interfaces, werden als *Bioaktivität* des Materials bezeichnet. Zu beachten ist an dieser Stelle, dass auch die Eigenschaft, im Kontakt mit Calcium- und Phosphat-haltigen Lösungen die Präzipitation von Apatit zu begünstigen und so eine für Gewebe- und Knochenkontakt gut geeignete Oberflächenschicht auszubilden, regelmäßig als Bioaktivität bezeichnet wird. Diese Eigenschaft eines Materials ist jedoch nicht zwangsläufig mit der zuvor genannten Definition der Bioaktivität gleichzusetzen [59]. *Osteokonduktive* Materialien wirken im Kontakt mit bereits vorhandenem Knochen als „Leitschiene“ für die Osteogenese.

Schließlich werden Biomaterialien als *osteoinduktiv* bezeichnet, die auch abseits des Knochens („ektop“) die Knochenneubildung induzieren. Dies wird jedoch lediglich von vitalen Transplantaten oder ggf. mit Wachstumsfaktoren wie BMPs beladenen oder auch zellbesiedelten Scaffolds im Bereich des *Tissue Engineering* erreicht.

Bis heute gelten *Autografts*, also patienteneigenes, an anderer Stelle entnommenes und an den Ort des Defekts verpflanztes Knochengewebe als sog. *Goldstandard*. Das Gewebe enthält gewebespezifische Zellen sowie Wachstumsfaktoren, die der Defektheilung zuträglich sind. Entsprechend können Autografts als osteoinduktiv bezeichnet werden. Die Verwendung körpereigenen Gewebes birgt weder die Gefahr der Übertragung von Krankheitserregern noch die einer Immunabwehrreaktion, jedoch ist die Menge des für die „Eigenspende“ zur Verfügung stehenden Gewebes begrenzt. Darüber hinaus wird eine weitere Defektstelle geschaffen, welche ebenfalls zu Komplikationen führen kann (Donor-seitige Morbidität). *Allografts*, von Spendern der gleichen Spezies stammende Knochenstücke, enthalten ebenfalls Wachstumsfaktoren und ggf. Zellen, bergen jedoch die Gefahr der Krankheitsübertragung und Immunreaktion. *Xenografts* wiederum bezeichnen Knochenmaterialien fremder Spezies, die nach entsprechender Prozessierung (meist einer chemischen Entfernung aller organischer Bestandteile) als Knochenersatzmaterial eingesetzt werden. Eine Sonderform der Xenografts stellt die sog. demineralisierte Knochenmatrix (DBM) dar: hier erhält man durch chemische Entfernung sämtlicher mineralischer Bestandteile aus z. B. bovinem Knochen ein aus Kollagen, Proteinen und diversen Wachstumsfaktoren bestehendes Material³ [57,60].

Daneben existieren zahlreiche synthetische und teilsynthetische Knochenersatzmaterialien, die gegenüber den natürlichen Knochenersatzmaterialien die Vorteile der unbegrenzten Verfügbarkeit sowie der einfacheren Sterilisier- und Prozessierbarkeit bieten. Jedoch erreichen synthetische Materialien nicht die z. B. für Allografts typische Osteoinduktivität. Zu den synthetischen Knochenersatzmaterialien zählen neben biokompatiblen Polymeren wie z. B. PLA (Polymilchsäure) oder PLGA (Co-Polymer aus PLA und Polyglykolsäure) auch resorbierbare Metalle (spezielle Magnesiumlegierungen) sowie Keramiken (insbesondere Calciumphosphatkeramik), Glaskeramiken und Biogläser [57,61–63]. Im Folgenden soll näher auf Calciumphosphate bzw. Calciumphosphat-Knochenzemente, welche den Gegenstand der vorliegenden Arbeit darstellen, eingegangen werden.

³ DBM wird auch aus humanem Spenderknochen hergestellt und kann somit auch als eine Form der Allografts betrachtet werden.

2.2.1 Calciumphosphate und Calciumphosphatzemente

Calciumphosphate (CaP) eignen sich aufgrund ihrer großen Ähnlichkeit zur mineralischen Phase des natürlichen Knochens hervorragend als Knochenersatzmaterialien. Entsprechend gibt es eine große Zahl kommerzieller Knochenersatzmaterialien auf CaP-Basis, die sich prinzipiell in gesinterte Keramiken und hydraulisch abbindende Zemente unterteilen lassen. In Tabelle 2.1 ist eine (nicht vollständige) Übersicht einiger kommerzieller CaP-Knochenersatzmaterialien dargestellt.

Tab. 2.1: Beispiele kommerzieller Knochenersatzmaterialien auf Basis von Calciumphosphaten.

Sinterkeramik		
Produktname	Zusammensetzung	Hersteller
Ostim	nanokristalliner HA, vollsynthetisch	Heraeus Kulzer
Cerasorb [®]	β -TCP, phasenrein	Curasan
Alaska [®]	70 % HA, 30 % β -TCP (biphasisch)	Argomedical
BoneCeramic [™]	60 % HA, 40 % β -TCP	Straumann
Knochenzemente		
Produktname	Hauptbestandteile → Reaktionsprodukt	Hersteller
Calcion [®]	α -TCP, DCPA, CaCO ₃ , CDHA → Apatit	Biomet
Mimix [™]	TTCP, α -TCP → Apatit	Biomet
α BSM [®] , Biobon	ACP, DCPD → Apatit	ETEX
Graftys [®] HBS	β -TCP, ACP, HA/ β -TCP → Apatit	Graftys
BoneSource [™]	TTCP, DCPD → Apatit	Stryker
Norian [®] SRS/CRS	α -TCP, CaCO ₃ , MPCM → Apatit	Synthes
Cementek [®]	α -TCP, TTCP → Apatit	Teknimed
Mimix [®]	TTCP, α -TCP → Apatit	W. Lorenz Surgical
Jectos Eurobone [®]	β -TCP → Bruschit	Kasios
VitaOS	β -TCP, MCPM, CaSO ₄ → Bruschit	Produit Dentaires SA
ChronOS [™]	β -TCP, MCPM, MgHPO ₄ → Bruschit	Synthes

Quelle: Herstellerinformationen.

Tab. 2.2: Übersicht verschiedener Calciumphosphatphasen (nach [62]).

Ca/P	Abkürzung	Bezeichnung	Chemische Formel	pH-Stabilitätsbereich bei 25 °C
0,5	MCPM	Calciumdihydrogenphosphat monohydrat	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0–2,0
0,5	MCPA	Calciumdihydrogenphosphat anhydrat	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$	-
1,0	DCPD	Bruschit	$\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	2,0–6,0
1,0	DCPA	Monetit	CaHPO_4	-
1,33	OCP	Octacalciumphosphat	$\text{Ca}_8(\text{HPO}_4)_2(\text{PO}_4)_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$	5,5–7,0
1,5	α -TCP	α -Tricalciumphosphat	$\alpha\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	-
1,5	β -TCP	β -Tricalciumphosphat	$\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	-
1,0–2,2	ACP	amorphes CaP	$\text{Ca}_x\text{H}_y(\text{PO}_4)_z \cdot n \text{H}_2\text{O}$	~5–12
1,5–1,67	CDHA	Ca-defizitärer HA	$\text{Ca}_{10-x}(\text{HPO}_4)_x(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{OH})_{2-x}$ ($0 < x < 1$)	6,5–9,5
1,67	HA	Hydroxylapatit	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	9,5–12
2,0	TTCP	Tetracalciumphosphat	$\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{O}$	-

Calciumorthophosphate

Calciumphosphate, bzw. Calciumorthophosphate, lassen sich anhand ihrer Stöchiometrie gliedern (siehe Tab. 2.2), wobei sich die einzelnen CaP-Phasen in ihren physikochemischen Eigenschaften unterscheiden. So sind beispielsweise lediglich amorphes Calciumphosphat und Hydroxylapatit (sowie Ca-defizitärer Hydroxylapatit, CDHA) unter physiologischen Bedingungen stabil. Weiterhin unterscheiden sich die einzelnen CaP in ihren biologischen Eigenschaften.

Calciumdihydrogenphosphat

Calciumdihydrogenphosphat (als Monohydrat oder in wasserfreier Form, MCPM und MCPA) kommt in biologischen Systemen nicht vor. Beide Phasen reagieren sehr sauer und besitzen unter physiologischen Bedingungen eine sehr hohe Löslichkeit [64, 65].

Calciumhydrogenphosphat: Monetit und Bruschit

Wasserfreies Calciumhydrogenphosphat (Monetit, DCPA) ist unter physiologischen Bedingungen gut löslich (siehe Tab. 2.3) und wurde in geringen Mengen im Frakturkallus nachgewiesen [64, 66]. Calciumhydrogenphosphat-dihydrat (Bruschit, DCPD) besitzt

ebenfalls eine hohe Löslichkeit und gilt als Zwischenstadium bei der Mineralisation und Degradation von Apatiten. Geringe Mengen an Brushit wurden im gesunden Knochengewebe nachgewiesen [64, 67].

Octacalciumphosphat

Octacalciumphosphat (OCP) kommt biologisch lediglich in Verkalkungen der Harnwege sowie in Zahnstein vor. Zudem wurden Spuren von OCP im Knochenmineral nachgewiesen. Außerdem gilt das thermodynamisch wenig stabile OCP als Zwischenprodukt in der knöchernen Mineralisation [62].

Tricalciumphosphat

Beide Phasen des Tricalciumphosphats, α -TCP und β -TCP sind unter physiologischen Bedingungen gut löslich (vgl. Tab. 2.3) und werden *in vivo* vergleichsweise schnell resorbiert. Als Knochenersatzmaterial wird meist β -TCP eingesetzt. Es gilt als osteokonduktiv und begünstigt an seiner Oberfläche die Präzipitation von Apatitkristallen in physiologischer Lösung (häufig als Bioaktivität bezeichnet, siehe Kap. 2.2) [64, 68].

Hydroxylapatit

Stöchiometrischer Hydroxylapatit (HA) wird als biokompatibel, bioaktiv sowie osteokonduktiv eingestuft. Er besitzt im physiologischen pH-Bereich eine äußerst geringe Löslichkeit (siehe Tab. 2.3) und ist daher physiko-chemisch kaum degradierbar, kann jedoch durch zelluläre Prozesse resorbiert werden. Allerdings zeigen HA-Oberflächen eine hohe Bioaktivität im Sinne spontaner Apatit-Kristallbildung in Ca^{2+} - und Phosphathaltiger, wässriger Umgebung. In Ca-defizitärer (CDHA) oder mit Fremdionen substituierter Form hingegen besitzt HA eine höhere Löslichkeit, was eine (langsame) Resorption sowie eine Integration in das *bone remodelling* ermöglicht. Mit zahlreichen Fremdionen dotierter CDHA stellt den anorganischen Anteil des natürlichen Knochens dar [62, 68, 69].

Tetracalciumphosphat

Tetracalciumphosphat (TTCP) besitzt einen stark basischen Charakter und eine höhere Löslichkeit als HA. TTCP wird als Komponente in manchen Knochenzementen verwendet, kommt jedoch in biologischen Systemen nicht vor [70].

Zementbildung aus Calciumorthophosphaten

Als Calciumphosphat-Knochenzemente werden ein- oder mehrkomponentige Mischungen pulverförmiger Orthophosphate sowie ggf. weiterer Phasen bezeichnet (Precursor-Pulver), die durch Mischung mit einer wässrigen Komponente formbare, selbst aushärtende Pasten bilden. Im Kontakt mit wässrigen Medien kommt es zur Lösung der einzelnen Precursorkomponenten (je nach Löslichkeit bei entsprechendem pH-Wert) und anschließend zur Ausscheidung des, ebenfalls pH-Wert abhängigen, Reaktionsprodukts. So besitzt, wie in Abbildung 2.8 dargestellt, bei pH-Werten oberhalb 4,2 Hydroxylapatit, bei $\text{pH} < 4,2$ Brushit die geringste Löslichkeit – je nach in der Zementpaste herrschendem pH-Wert bindet der Zement in die eine oder andere Phase ab. Entsprechend werden Hydroxylapatit- und Brushit-bildende Zemente unterschieden. Treibende Kraft der Abbindereaktion ist also die unterschiedliche Löslichkeit bzw. Stabilität der Precursorkomponenten bzw. der Reaktionsprodukte (Tab. 2.3).

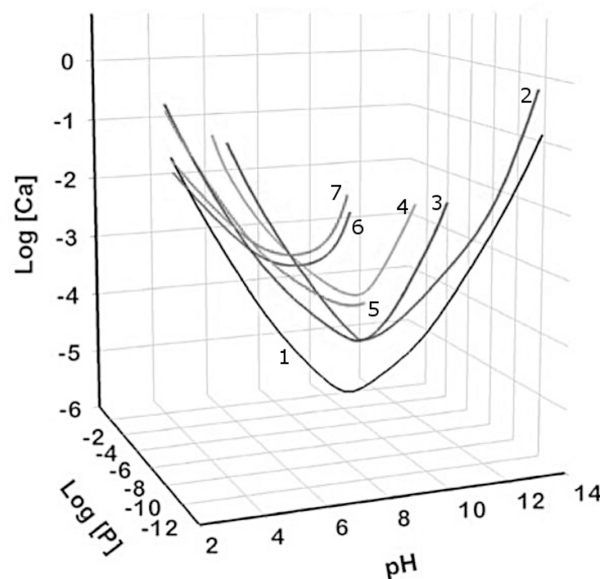


Abb. 2.8: Löslichkeit verschiedener Calciumphosphatphasen in Abhängigkeit des pH-Werts sowie der Calcium- und Phosphatkonzentration. 1: HA; 2: TTCP; 3: β -TCP; 4: α -TCP; 5: OCP; 6: DCPA; 7: DCPD. Verändert nach: [71].

CaP-Zemente können innerhalb der Verarbeitungszeit, charakterisiert durch die initiale Abbindezeit t_i , in den Knochendefekt modelliert werden und erreichen nach der finalen

Tab. 2.3: Löslichkeit verschiedener Zementkomponenten [64, 72–75].

	α -TCP	DCPA	HA	CaCO_3	DCPD	SrCO_3	$\text{SrH}(\text{PO}_4)$
$(-\log(K_{sp}))$	25,5	6,9	116,8	4,9	6,6	8,1	6,7–6,9

Abbindezeit t_f eine ausreichende Festigkeit, um die Operationswunde zu schließen. Danach kommt es im wässrigen Milieu des Organismus zur weiteren Umsetzung des Precursors in das Endprodukt, beispielsweise Ca-defizitären Hydroxylapatit (CDHA). Eine schematische Darstellung dieses Prozesses ist in Abbildung 2.9 gezeigt. Es wurden bislang zahlreiche Zement-bildende Systeme beschrieben, wobei typische Mischungen auf α -TCP, β -TCP, DCPA oder OCP basieren [76, 77].

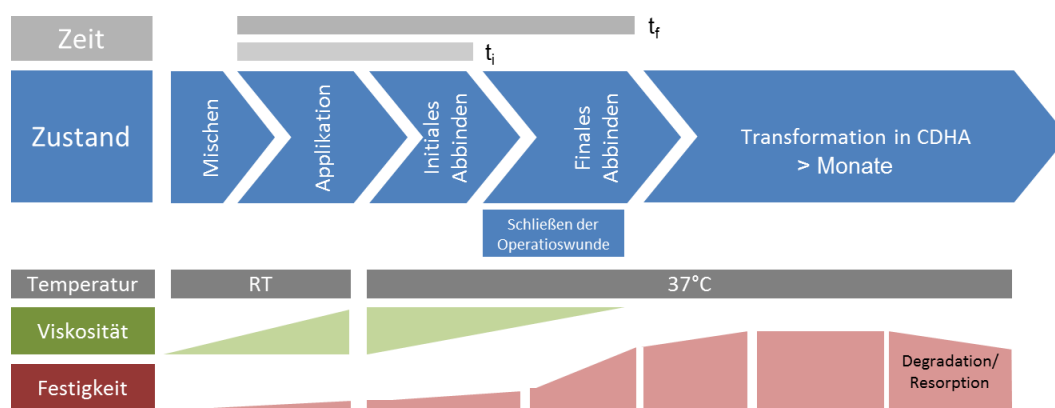


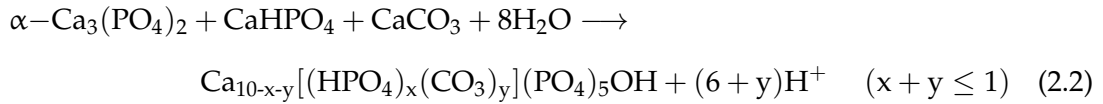
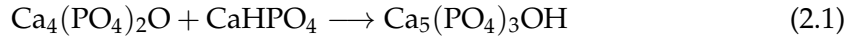
Abb. 2.9: Schematischer Ablauf der Verarbeitung und der Aushärtung von CaP-Zementen.

Hydroxylapatit-bildende Zemente

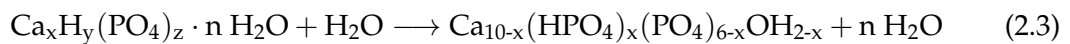
Die Bildung von Hydroxylapatit-Zementen basiert entweder auf einer Säure-Base-Reaktion oder auf der Reaktion einer oder mehrerer CaP-Phasen in ein Produkt gleichen Ca/P-Verhältnisses. In beiden Fällen ist das Reaktionsprodukt Hydroxylapatit bzw. Ca-defizitärer, Carbonat-haltiger Hydroxylapatit geringer Kristallinität.

Die folgenden Gleichungen beschreiben beispielhaft für Reaktionen nach dem Säure-Base-Prinzip die Hydroxylapatitbildung aus Tetracalciumphosphat (basisch) und DCPA

(neutral, Gl. 2.1) sowie α -TCP (leicht basisch) und Calciumhydrogenphosphat (leicht sauer, Gl. 2.2) [76–78]:

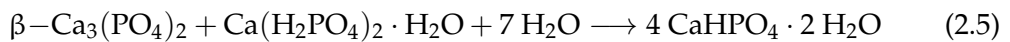


Apatit-bildende Reaktionen mit konstantem Ca/P-Verhältnis basieren auf der Hydrolyse und Reprazipitation einzelner CaP-Phasen, wie etwa ACP (Gl. 2.3) oder α -TCP (Gl. 2.4) [76,77].



Bruskit-bildende Zemente

Die Bildung von Bruskit als Endprodukt der Zementierungsreaktion basiert stets auf Reaktionen nach dem Säure-Base-Prinzip. Beispielfhaft sei hier die Reaktion von β -TCP mit MCPM genannt, bei der sich bei pH-Werten unterhalb 4,2 Bruskit bildet [76]:



2.2.2 Strontium-haltige Knochenzemente

Aufgrund seines positiven Einflusses auf die Knochenneubildung sowie seiner antiresorptiven Wirkung wurde Strontium bereits verschiedentlich in Knochenzemente integriert. Ein Überblick Über Strontium-haltige Zementsysteme ist in Tabelle 2.4 zu finden. Zahlreiche dieser in der Literatur beschriebenen Zemente basieren auf der Verwendung Sr-haltiger Precursorphasen, was jedoch einen besonderen Aufwand zur Herstellung dieser Komponenten mittels Fällung oder thermischer Verfahren erfordert. Ein Beispiel für die Übertragung eines für CaP-Zemente etablierten Systems auf einen Sr-haltigen Zement mit Hilfe einer Sr-substituierten Ausgangsphase beschrieben Saint-Jean *et al.*: So führt die Hydrolyse von **Sr-substituiertem α -TCP** zu (Sr-haltigem) CDHA. Die Sr-haltige Precursorphase wurde durch Reaktion von $\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$ mit CaCO_3 und SrCO_3 bei 1500°C hergestellt [85].

Tab. 2.4: Auswahl in der Literatur beschriebener, Sr-haltiger Knochenzementsysteme.

Calciumphosphatzemente				
Zementtyp	Sr-Quelle	Ausgangsphasen	Reaktionsprodukt	Referenz
Apatit	fest	TTCP, DCPA, DSPA	Sr-HA	[79]
Apatit	fest	ACP, ASP, DCPD	Sr- und Ca-Apatit	[80]
Apatit	fest	SrACP, DCPD	SrHA	[80,81]
Apatit	fest	SrACP, DCPA	SrHA (+ SrCO ₃)	[82]
Apatit	fest	DCPD, CaO, SrCO ₃	SrHA	[83]
Apatit	fest	Vaterit-CaCO ₃ , DCPD, SrCO ₃	SrHA + SrCO ₃	[84]
Apatit	fest	Sr- α -TCP	SrHA	[85]
Bruschit	fest	Sr- β -TCP, MCPM	SrDCPD	[86]
Bruschit	fest	Sr- α -TCP, MCPM	SrDCPD	[87]
Bruschit	fest	β -TCP, MCPM, SrCl ₂ , (CPP)	SrDCPD	[88]
Bruschit	fest	β -TCP, MCPM, SrCl ₂ , (NaPP)	SrDCPD	[89]
Apatit	flüssig	α -TCP, SrCl ₂ -Lösung	SrHA	[90]
Apatit	flüssig	Vaterit-CaCO ₃ , DCPD, SrCl ₂ -Lösung	SrHA	[84]
Apatit	flüssig	α -TCP, TTCP, Sr(NO ₃) ₂ -Lösung (fl.)	SrHA	[91]
Polymer-basierte Zemente				
Zementtyp	Sr-haltige Komponente bzw. Füllstoffe			Referenz
PMMA, gefüllt	SrHA, Silikat			[92]
PMMA, gefüllt	SrHA			[93]
PMMA, gefüllt	Sr-Ca-Zi-Silikat-Glas			[94]

DSPA: Di-Strontiumphosphat Anhydrat, ASP: amorphes Strontiumphosphat

SrACP: Sr-haltiges ACP, CPP: Ca-Pyrophosphat, NaPP: Na-Pyrophosphat

Auch **Strontiumphosphat** (in kristalliner oder amorpher Form) kann zur Herstellung Sr-haltiger Zemente verwendet werden. So beschreiben Guo *et al.* eine Precursormischung aus TTCP, DCPA, und SrHPO₄ (DSPA) mit verdünnter Phosphorsäure als wässrige Komponente, die je nach mit Hilfe des DCPA/DSPA-Verhältnisses eingestelltem Sr/(Sr+Ca)-Verhältnis Druckfestigkeiten bis zu 66 MPa erreichen. Hierzu wurde DSPA aus einer Lösung von Sr(NO₃)₂ und (NH₄)HPO₄ gefällt [79]. Einen interessanten Ansatz beschreiben Wang *et al.*: Precursormischungen von amorphem Calciumphosphat, amorphem Strontiumphosphat (ebenfalls durch Fällung hergestellt) sowie DCPD bilden eine Matrix aus nebeneinander vorliegendem Sr- und Ca-Apatit, während Sr-substituiertes, amorphes Calciumphosphat (SrACP) mit DCPD zu einphasigem, Sr-

substituiertem Apatit abbindet [80,81]. Eine Weiterentwicklung dieses Systems beruht auf der Mischung des SrACP mit wasserfreiem DCPA, wobei hier neben SrHA auch SrCO_3 im abgebundenen Zement vorliegt [82].

Strontiumcarbonat eignet sich ebenfalls als Sr-Quelle, wie von Romieu *et al.* beschrieben: ein Precursor aus DCPD, Calciumoxid und SrCO_3 bildet bei einem Verhältnis der Bestandteile von 6/2,5/1,5 M einen zu SrHA abbindenden Zement, der Festigkeiten bis zu 20 MPa erreicht [83]. Auch in Verbindung mit einem CaCO_3 -DCPD basierten, Apatit-bildenden Precursor kann SrCO_3 als Sr-Quelle verwendet werden [84]. Der Vorteil dieser Verfahren besteht in der einfachen Verfügbarkeit des SrCO_3 , das nicht eigens synthetisiert werden muss.

Bruschit-bildende Zemente mit Sr-Modifikation wurden ebenfalls bereits beschrieben: so verwenden Alkhraisat *et al.* **Sr-substituiertes β -TCP**, um in äquimolarer Mischung mit MCPC ein zu SrDCPD abbindendes Gemisch zu erhalten [86]. Mit ca. 13 Gew.-% ermöglicht dieses Verfahren die höchsten Sr-Gehalte im Zement und, auch aufgrund der guten Resorbierbarkeit von Bruschit, die höchsten Sr-Freisetzungsraten. Sr- β -TCP wurde durch Sinterung von CaHPO_4 mit CaCO_3 und SrCO_3 in verschiedenen Verhältnissen hergestellt. Ein ähnliches Zementssystem, jedoch mit Sr-substituiertem α -TCP als Precursor, wurde von Pina *et al.* beschrieben [87].

Ebenfalls zu SrDCPD bindet ein Precursor auf Basis von β -TCP, MCPM, **Strontiumchlorid** (SrCl_2) und/oder Natriumpyrophosphat (NaPP) ab, wobei nur die gleichzeitige Modifikation mit SrCl_2 und Pyrophosphat zu einer Verbesserung der mechanischen Eigenschaften führte [88]. Von vergleichbaren Ergebnisse berichten auch von Engstrand *et al.* bei Verwendung von Calciumpyrophosphat (CPP) [89]. Ebenfalls SrCl_2 verwenden Panzavolta *et al.*, allerdings in einem α -TCP-basierten, zu Hydroxylapatit abbindenden Zementssystem, welches 15 % Gelatine enthält und somit ein Kompositmaterial darstellt. Beschrieben wird eine leichte Zunahme der Abbindezeiten und, zu späteren Zeitpunkten, ein Rückgang der mechanischen Festigkeit [95].

Neben der Beimischung fester, Sr-haltiger Phasen zum Zementprecursor führt eine zweite mögliche Route über die Flüssigkomponente. So beschreiben Fujihara *et al.* einen Apatitzement aus phasenreinem α -TCP, der durch Anmischen mit **SrCl_2 -haltiger Lösung** zu SrHA abbindet, der eine gegenüber reinem HA-Zement erhöhte Löslichkeit besaß [90].

Ebenso wurde eine SrCl_2 -haltige Abbinde­lösung in der bereits erwähnten Studie von Tadier *et al.* verwendet, jedoch in einem auf CaCO_3 -DCPD basierenden Precursor [84].

Auch **Strontiumnitrat** wurde bereits zur Herstellung apatitischer Sr-Zemente genutzt: Leroux *et al.* konnten durch Verwendung einer $\text{Sr}(\text{NO}_3)_2$ -haltigen Abbinde­lösung Sr-substituierte HA-Zemente mit bis zu 4,3 Gew.-% Sr-Gehalt herstellen [91].

3 Materialien und Methoden

3.1 Calciumphosphat-Knochenzement

3.1.1 Ausgangsmaterial (CPC)

Als Ausgangsmaterial für die in dieser Arbeit durchgeführten Materialmodifikationen diente ein von der Firma InnoTERE GmbH (Radebeul) zur Verfügung gestellter Pulver-Flüssigkeitszement (im Folgenden bezeichnet als CPC) auf Basis von α -Tricalciumphosphat (α -TCP). Das Precursor-Pulver bestand zu 58 Gew.-% aus α -TCP, 24 Gew.-% Calciumhydrogenphosphat (Anhydrat, DCPA) sowie jeweils 8,5 Gew.-% Hydroxylapatit (HA) und Calciumcarbonat (CaCO_3). Durch Mischen dieses Precursor-Pulvers mit einer 4 %-igen Na_2HPO_4 -Lösung (Sigma-Aldrich) erhielt man eine Zementpaste, die innerhalb einer bestimmten Zeit abbindet (sog. *Abbindezeit*). Entscheidender Parameter war hierbei die pro g Zementpulver eingesetzte Flüssigkeitsmenge (*liquid to powder ratio*, l/p-Verhältnis), durch die sich die Viskosität der Zementpaste sowie deren Abbindeverhalten variieren lassen. Für den in dieser Arbeit verwendeten CPC ließen sich l/p-Verhältnisse im Bereich 350–500 $\mu\text{l/g}$ verwenden. Nach dem Aushärten des Zements erfolgte aufgrund der stöchiometrischen Zusammensetzung in wässriger Umgebung eine Umsetzung zu Calcium-defizitärem Hydroxylapatit (CDHA) als Endprodukt der Abbindereaktion.

3.1.2 Strontium-Modifikationen des CaP-Zements

Zur Modifikation des Ausgangszements mit Sr^{2+} -Ionen wurden drei unterschiedliche Ansätze verfolgt: einerseits wurde dem Precursor-Pulver mit Hilfe einer automatischen Mühle (Gastroback) bis zu 10 Gew.-% Strontiumcarbonat (SrCO_3 , Alfa Aesar) beige-mischt (*A-Typ*). Um den dabei entstehenden Überschuss an CaCO_3 zu kompensieren

und ggf. die Bildung einer Sr-haltigen Phase zu begünstigen, wurde in *B-Typ* modifizierten Proben ein entsprechend erhöhter Anteil von DCPA verwendet. Schließlich wurde das im Zement enthaltene CaCO_3 teilweise oder vollständig durch SrCO_3 ersetzt (*S-Typ*), um unter Beibehaltung des (Sr+Ca)/P-Verhältnisses eine Substitution von Ca^{2+} - durch Sr^{2+} -Ionen zu erreichen¹. In Tabelle 3.1 sind die Zusammensetzungen der verschiedenen Zementvarianten angegeben. Wie auch im Fall des CPC wurde 4 %-ige Na_2HPO_4 -Lösung zur Herstellung der Zementpaste verwendet und das l/p-Verhältnis zwischen 350 und 500 $\mu\text{l/g}$ variiert.

Tab. 3.1: Zusammensetzung der verschiedenen Zementmischungen.

Bez.	Zusammensetzung [Gew.-%]					Sr-Gehalt		Ca/P	(Ca+Sr)/P	Sr/(Sr+Ca)
	α -TCP	DCPA	CaCO_3	HA	SrCO_3	At.-%	Gew.-%			
CPC	60,0	26,0	10	4,0	–	–	–	1,514	1,514	0
A5	57,1	24,8	9,5	3,8	4,8	0,72	2,83	1,514	1,570	0,036
A10	54,5	23,6	9,1	3,6	9,1	1,39	5,40	1,514	1,626	0,069
B5	48,1	34,7	8,0	3,2	5,9	0,88	3,52	1,424	1,514	0,046
B10	42,6	37,0	7,1	2,9	10,5	1,57	6,23	1,390	1,514	0,083
S50	58,6	25,4	4,9	3,9	7,2	1,10	4,28	1,431	1,514	0,055
S100	57,3	24,8	–	3,8	14,1	2,21	8,36	1,348	1,514	0,110

3.1.3 Charakterisierung der Zementpasten

Die Verarbeitungseigenschaften einer Zementpaste lassen sich mit Hilfe des in ASTM C266-99 „Standard Test Method for Time of Setting of Hydraulic- Cement Paste by Gillmore Needles“ (1. November 1999) definierten Verfahrens anhand ihrer Abbindezeit (*setting time*) beschreiben. Der sog. Gillmore-Apparat besteht aus 2 Nadeln unterschiedlichen Durchmessers und Gewichts (Gewicht 1: $m_1 = 113,4$ g und $d_1 = 2,13$ mm; Gewicht 2: $m_2 = 453,6$ g und $d_2 = 1,06$ mm; siehe Abb. 3.1). Durch Auflegen der Nadeln auf eine Pro-

¹ Die S-Typ Precursor-Pulver wurden gemäß der in Tabelle 3.1 angegebenen Zusammensetzungen von der Firma InnoTERE gemischt und vermahlen.

be des frisch präparierten Zements lassen sich somit zwei unterschiedliche, definierte Belastungszustände realisieren. Hierbei werden jeweils zwei Zeitpunkte als charakteristisch definiert: der Zeitraum, in dem die Zementpaste soweit ausgehärtet ist, dass das kleinere Gewicht des Gillmore-Prüfgeräts keinen sichtbaren Eindruck mehr in einer frisch präparierten Zementprobe hinterlässt, wird als initiale Abbindezeit (*initial setting time, t_i*) definiert. Entsprechend wird mit Hilfe der zweiten Nadel die finale Abbindezeit (*final setting time, t_f*) definiert. Es wurden jeweils 6 Wiederholungsmessungen pro Zementvariante und l/p-Verhältnis durchgeführt.

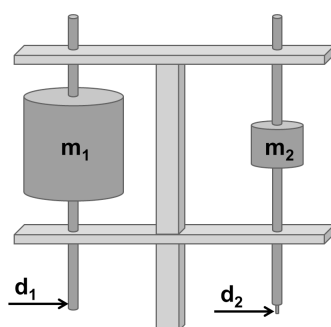


Abb. 3.1: Schematische Darstellung des Gillmore-Apparats, bestehend aus 2 Nadeln unterschiedlichen Durchmessers und Gewichts in entsprechender Halterung.

3.1.4 Probenherstellung

Für die Festigkeitsprüfung wurden quaderförmige (ca. $12 \times 6 \times 6$ mm), für alle anderen Charakterisierungen Plättchen-förmige Zementproben ($d = 1$ mm, $\varnothing = 10$ mm) hergestellt. Dazu wurde die mittels Spatel frisch angerührte Zementpaste möglichst ohne Luftblasen in entsprechende Silikonformen gestrichen und abgedeckt, um ein Austrocknen zu verhindern. Nach 24 h wurden die Proben entnommen und an Luft getrocknet. Zum weiteren Aushärten wurden die Proben in einem geschlossenen Behälter mit Wasserreservoir bei 37°C ausgelagert².

²In früheren Arbeiten wurde die Auslagerung des CPC in Wasser, PBS oder physiologischer Pufferlösung durchgeführt [96,97]. Da in der vorliegenden Arbeit jedoch die Wirkung der aus dem Zement freigesetzten Ionen untersucht werden soll, wurde die Auslagerung in feuchter Atmosphäre durchgeführt, um ein vorzeitiges Auswaschen dieser Ionen zu verhindern.)

3.2 Materialcharakterisierung

3.2.1 Röntgendiffraktometrie (XRD)

Zur Analyse der Phasenzusammensetzung während des Abbindens der Zemente wurden unterschiedlich lang ausgelagerte Proben mittels Achatmörser zerkleinert und röntgendiffraktometrisch untersucht. Die Messungen wurden mit einem Bruker D8 Discover Diffraktometer mit Vantec 2000 Detektor durchgeführt (Dr. Ruhnow, Institut für Werkstoffwissenschaft, TU Dresden). Dabei wurde Kupfer-K α -Strahlung mit einer Wellenlänge von $\lambda = 1,542 \text{ \AA}$ verwendet. Die Rietveld-Analyse zur quantitativen Bestimmung der Phasengehalte wurde freundlicherweise von Dr. Rosseeva (Max-Planck-Institut für Chemische Physik fester Stoffe, Dresden) durchgeführt.

3.2.2 Infrarotspektroskopie (FTIR)

Weiterhin wurde die Phasenzusammensetzung mittels Fourier-transformierter Infrarotspektroskopie (FTIR) untersucht. Mittels Achatmörser zerkleinerte Zementproben wurden mit KBr (Sigma) vermischt, pelletiert und mittels IR-Transmission im Bereich $4000\text{-}450 \text{ cm}^{-1}$ mit einer Auflösung von 4 cm^{-1} untersucht (Spectrum 2000, Perkin Elmer).

3.2.3 Rasterelektronenmikroskopie und Elementanalyse (EDX)

Zur Untersuchung ausgehärteter Zementproben mittels Rasterelektronenmikroskopie (REM) wurden diese zunächst mit Hilfe leitfähiger Kohlenstoffpads auf REM-Träger aufgeklebt, mit Leitsilber abgeleitet und anschließend mit Kohlenstoff bedampft (Leica EM SCD005, Leica Microsystems). Die Proben wurden im Rasterelektronenmikroskop (Phillips ESEM XL30, ausgestattet mit einem EDAX-System zur Energie-dispersiven Röntgenanalyse, EDX) bei einer Beschleunigungsspannung von max. 6 kV im REM-Modus (Hochvakuum) betrachtet.

3.2.4 Massenspektrometrie (ToF-SIMS)

Die Flugzeit-Sekundärionenmassenspektrometrie (engl. *time of flight secondary ion mass spectrometry*, ToF-SIMS) ist eine aus der chemisch-physikalischen Analytik stammende

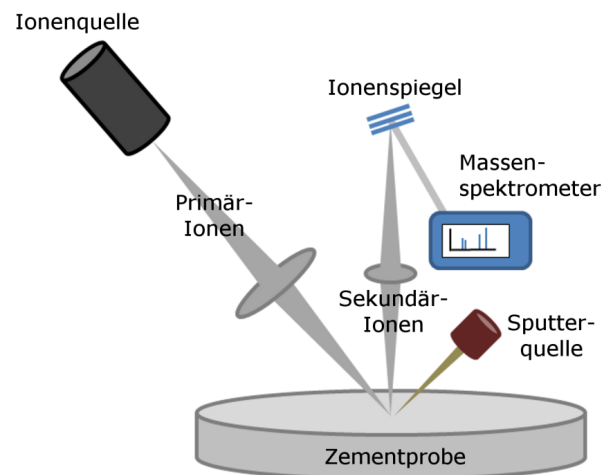


Abb. 3.2: Funktionsprinzip der Flugzeit-Sekundärionenspektrometrie (ToF-SIMS). Nach: http://www2.fkf.mpg.de/ga/machines/sims/How_does_TOF_SIMS_work.html am 05.03.2014.

de Technik, welche erst in den letzten Jahren in der Lebenswissenschaft zum Einsatz kommt. Während der Untersuchung wird die zu analysierende Probenoberfläche mit einem gepulsten Primär-Ionenstrahl (hier: Bismut, Bi^+ mit 25 keV) beschossen, wobei sog. Sekundärteilchen, also geladene Ionen oder neutrale Atome oder Molekülfragmente freigesetzt werden (Abb. 3.2). Positiv und negativ geladene Ionen werden anschließend mittels eines Flugzeit-Massenspektrometers identifiziert. Mit Hilfe einer weiteren Sputterquelle für Sauerstoff (O_2^+ mit 1–2 keV) ist es darüber hinaus möglich, die Oberfläche der Zementproben schichtweise abzutragen und so auch Tiefenprofile der Proben sowie 3D-Rekonstruktionen der chemischen Zusammensetzung zu erstellen. Die ToF-SIMS-Messungen wurden mit Hilfe eines TOF-SIMS 5-100 (IONOTOF) durchgeführt und mit spezieller Software (Surface Lab 6.3) ausgewertet (AG Prof. Janek, Institut für Physikalische Chemie, Justus-Liebig Universität Gießen).

3.2.5 Dichte, Porosität und Rauheit

Die Dichte und die daraus zu errechnende Porosität der verschiedenen Zementvarianten wurde mit Hilfe eines Heliumpyknometers (Ultrapyk 1200e, Quantachrome) bestimmt. Die Pyknometer-Dichte (ρ_{pyk}) entspricht dabei der Masse der trockenen Zementprobe, bezogen auf das im Pyknometer verdrängte Gasvolumen. Die offene Porosität der jeweiligen Probe errechnet sich mit Hilfe der geometrischen Dichte (ρ_{geo} , Masse der Probe

bezogen auf ihr aus den äußeren Abmessungen bestimmtes Volumen) anhand Formel 3.1:

$$\epsilon_{offen} = \left(1 - \frac{\rho_{geo}}{\rho_{pyk}}\right) \cdot 100\% \quad (3.1)$$

Die Rauheit der frisch hergestellten, 4 Tage in feuchter Atmosphäre ausgehärteten sowie 7 Tage in Zellkulturmedium ausgelagerten Proben wurde mittels Weißlicht-Interferometrie (FR Micro Prof, CHR 15 N) gemessen und mit Hilfe entsprechender Software (FRT Mark III V3.9.10, Fries Research & Technology) am Institut für Komplexe Materialien (AG Prof. Eckert, Leibniz-Institut für Festkörper- und Werkstoffforschung Dresden) hinsichtlich der mittleren sowie quadratischen Rauheit (R_a bzw. R_q) ausgewertet.

3.2.6 Mechanische Charakterisierung

Zur Bestimmung der mechanischen Eigenschaften der Zementvarianten wurden sowohl deren Druckfestigkeit als auch die Zugfestigkeit anhand des *ball on three balls*-Test bestimmt.

Druckfestigkeit

Die für die Druckfestigkeitsprüfung vorgesehenen, quaderförmigen Zementproben wurden nach der Herstellung für bis zu 14 Tage in feuchter Atmosphäre ausgelagert und vor der Prüfung an Luft getrocknet. Die Prüfung erfolgte mit Hilfe einer Kraftprüfmaschine (Modell 5566, Instron), ausgestattet mit einer 10 kN Kraftmessdose und einer Prüfgeschwindigkeit von 1 mm/min. Aus der gemessenen Maximalkraft ($F_{\max, D}$) wurde anhand der Querschnittsfläche (A) der jeweiligen Probe die Druckfestigkeit laut Gleichung 3.2 berechnet. Es wurden je Zustand $n = 6$ Proben verwendet und die Ergebnisse statistisch ausgewertet.

$$\sigma_{\text{Druck}} = \frac{F_{\max, D}}{A} \quad (3.2)$$

Biaxiale Zugfestigkeit

Zur Ermittlung der biaxialen Zugfestigkeit der Zementvarianten wurde der sog. *Ball on three Balls*-Test verwendet [98, 99]. Hierbei wurden plättchenförmige Zementproben für bis zu 14 Tage in feuchter Atmosphäre ausgelagert und im getrockneten Zustand getestet, indem die Proben von 3 Kugeln gestützt mittels einer 4. Kugel bis zum Bruch

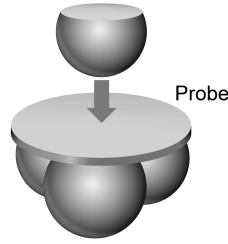


Abb. 3.3: Versuchsaufbau beim *Ball on three Balls*-Test: gelagert auf 3 gleich großen Kugeln wird eine Plättchen-förmige Probe senkrecht mit einer vierten Kugel gleichen Durchmessers bis zum Bruch belastet.

belastet wurden (siehe Abb. 3.3). Die Messungen wurden mit einer Zwick Z010 Universalprüfmaschine, ausgestattet mit einer 5 kN Kraftmessdose und einer Vorschubgeschwindigkeit von 0,5 mm/min durchgeführt. Es wurden jeweils $n = 6$ Proben pro Zustand getestet und die Ergebnisse statistisch ausgewertet. Anhand der maximal gemessenen Kraft ($F_{\max, \text{B3B}}$) sowie der Probendicke (d) wurde anhand Gleichung 3.3 die maximale Zugfestigkeit der jeweiligen Probe berechnet.

$$\sigma_{\text{B3B}} = f \cdot \frac{F_{\max, \text{B3B}}}{d^2} \quad (3.3)$$

Dabei bezeichnet f einen Formfaktor, der anhand des Probenradius R , des Radius der Mittelpunkte der unterstützenden Kugeln R_a sowie der Poissonzahl ν_{CPC} anhand Gleichung 3.4 ermittelt wurde.

$$f\left(\frac{d}{R}, \frac{R_a}{R}, \nu\right) = c_0 + \frac{c_1 + c_2 \frac{d}{R} + c_3 \left(\frac{d}{R}\right)^2 + c_4 \left(\frac{d}{R}\right)^3}{1 + c_5 \frac{d}{R}} \cdot \left(1 + c_6 \frac{R_a}{R}\right) \quad (3.4)$$

3.2.7 Ionenfreisetzung

Die Freisetzung von Sr^{2+} - sowie die Konzentration von Ca^{2+} - und Phosphat-Ionen wurden während der Auslagerung von Sr-modifizierten Zementen in NaCl/TRIS-Puffer sowie in Zellkulturmedium gemessen. Dazu wurden für 4 Tage in gesättigter Atmosphäre ausgehärtete Zementplättchen (10 mm Durchmesser) für bis zu 21 Tage im entsprechenden Medium (1 ml/Probe) inkubiert. Nach 3, 5, 7, 14 und 21 Tagen wurden die Überstände gesammelt und bis zur Analyse bei -21°C gelagert. Die Proben wurden anschließend mit 13,5 ml MilliQ-Wasser sowie 0,5 ml Salpetersäure (HNO_3 , Roth) verdünnt, durch $0,45 \mu\text{m}$ Spritzenfilter (TPP) filtriert und die Ionenkonzentrationen

mittels ICP-MS (*Inductively coupled plasma mass spectrometry*, IRIS Intrepid II XUV, Thermo Fisher Scientific) bestimmt (AG Prof. Eckert, Leibniz-Institut für Festkörper- und Werkstoffforschung Dresden).

3.2.8 Röntgendichte

Die Röntgendichte des CPC bzw. der modifizierten Zemente wurde anhand eines auf ISO EN 6876:2001 basierenden Tests ermittelt: zunächst wurden von plättchenförmigen Zementen mit 10 mm Durchmesser und 1 mm Höhe Röntgenaufnahmen angefertigt (AMX 4, General Electrics, Arbeitsabstand 300 mm und 65 kV, 0,5 mAs), wobei ein Treppen-förmiger Aluminium-Standard mit 0,5 mm Stufendicke (siehe Abb. 3.4) mitgeführt wurde (Dr. Spekl, Experimentelles Zentrum der TU Dresden). Anschließend wurden die Grauwerte der einzelnen Zemente in der Röntgenaufnahme bestimmt (Software: ImageJ 1.44p) und anhand des Aluminium-Standards in äquivalente mm-Al-Werte umgerechnet.



Abb. 3.4: Aluminium-Standard mit 0,5 mm-Stufen zur Ermittlung der Röntgendichte.

3.3 Verwendete Zellen und Zellkulturbedingungen

Zur Untersuchung des Einflusses der modifizierten CaP-Knochenzemente auf die Osteogenese kamen primäre humane mesenchymale Stammzellen (hMSC), zur Charakterisierung der Osteoklastogenese primäre humane Monozyten zum Einsatz.

3.3.1 Humane mesenchymale Stammzellen (hMSC)

Die verwendeten hMSC wurden aus dem Knochenmark dreier gesunder Spender (interne Spender-Bezeichnung 40, 41 und 315) isoliert und freundlicherweise von Prof. Bornhäuser (Medizinische Klinik I, Universitätsklinikum Carl Gustav Carus, Dresden) zur Verfügung gestellt. Für alle Versuche wurden Zellen der 4. oder 5. Passage verwendet.

Als Standard-Zellkulturmedium wurde α MEM mit 9 % fötalem Kälberserum (FCS, Charge 194x), 100 U/ml Penicillin, 100 μ g/ml Streptomycin und 2 mM L-Glutamin (alle Reagenzien bezogen von Biochrom) verwendet. Zur Stimulation der osteogenen Differenzierung wurden dem Medium außerdem 10^{-8} M Dexamethason (DEX), 5 mM β -Glycerophosphat (β -GP) sowie 0,05 mM Ascorbinsäure-2-phosphat (jeweils Sigma-Aldrich) als osteogene Supplemente zugegeben (Differenzierungsmedium, OS⁺).

Die Kultivierung der Zellen erfolgte bei 37 °C im CO₂-Inkubator (5 % CO₂). hMSC wurden in Medium ohne osteogene Supplemente (OS⁻) in T175 Zellkulturflaschen (Sarstedt) bis ca. 80 % Konfluenz expandiert. Nach Entfernung des Zellkulturmediums wurden die adhärent wachsenden Zellen zunächst mit PBS gewaschen und mit Hilfe von Trypsin/EDTA (Biochrom) vom Flaschenboden gelöst. Durch Zugabe des serumhaltigen Mediums wurde die Aktivität des Trypsins gestoppt. Zur Bestimmung der Zellzahl wurde ein ScepterTM 2.0 Cell Counter (Millipore) verwendet. Die Zellen wurden anschließend für 5 min bei 1.500 rpm pelletiert (Multifuge 4 KS-R, Haereus) und in frischem Medium resuspendiert.

3.3.2 Primäre humane Monozyten

Monozyten sind keine proliferierenden Zellen, daher wurden primäre humane Monozyten aus Leukozytenkonzentraten, sog. *buffy coats* (DRK-Blutspendedienst Ost, Dres-

den) isoliert. Zunächst wurden die *buffy coats* im Verhältnis 1:2 mit PBS/2 mM EDTA verdünnt. Anschließend konnten Erythrozyten und Granulozyten mittels Dichtezentrifugation (10 min, 1.000 g) über Ficoll-PaqueTM PLUS Separationsmedium in LeucosepTM-Zentrifugenröhrchen (Greiner Bio-One) entfernt werden. Die so erhaltene Fraktion peripherer mononukleärer Zellen (*peripheral blood mononuclear cells*, PBMC) wurde anschließend durch zweimalige Aufnahme in eiskaltem PBS-Puffer und erneute Zentrifugation (250 g, 15 min bei 4 °C) gewaschen.

Anschließend wurden die Monozyten mit *CD14 microbeads* (Miltenyi Biotec GmbH) markiert und mit Hilfe des *Magnetic Cell Separation Systems* (MACS[®] separation columns LS und QuadroMACSTM separation unit, Miltenyi Biotec GmbH) entsprechend der Herstellerangaben isoliert. Die so gereinigte Zellfraktion wurde für die unter Kapitel 3.4.1 beschriebenen Versuche mit unterschiedlichen Sr^{2+} -Konzentrationen verwendet.

Für *in vitro*-Untersuchungen im direkten Materialkontakt wurde auf die Isolierung CD14-positiver Zellen verzichtet und die Zellen stattdessen zwischen den beschriebenen Waschschritten in eiskaltem PBS für 30 s in 2 ml deionisiertem Wasser aufgenommen. Auf diese Weise wurden in der PBMC-Fraktion verbliebene Erythrozyten entfernt [100]. Anschließend wurde die so erhaltene Zellfraktion verwendet. Bei dem am ersten Tag nach der Besiedelung stattfindenden Mediumswechsel wurden alle nicht-adhärenz Zellen (z. B. T-Lymphozyten und B-Zellen) vom Material entfernt.

Die Monozyten wurden zunächst in α MEM mit 9 % FCS (Charge 194x), 100 U/ml Penicillin, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Streptomycin und 2 mM L-Glutamin sowie 25 ng/ml M-CSF (*Macrophage colony-stimulating factor*, antibodies-online Inc.) kultiviert und ab dem 3. Tag mit 50 ng/ml RANKL (*Receptor activator of nuclear factor κ -B ligand*, antibodies-online Inc.) zur Differenzierung in Osteoklasten stimuliert (OC⁺-Medium). Die Kultivierung der Zellen erfolgte wiederum bei 37 °C im CO₂-Inkubator (5 % CO₂).

3.4 Versuchsbedingungen

Um den Einfluss von CPC sowie dessen Strontium-Modifikationen auf Proliferation und osteogene Differenzierung von hMSC sowie die Osteoklastogenese aus Monozyten zu untersuchen wurde ein dreistufiger Versuchsablauf gewählt (vgl. Abb. 3.5):

- Zunächst wurde der *Einfluss unterschiedlicher SrCl_2 -Konzentrationen auf Osteogenese und Osteoklastogenese* untersucht, um unabhängig von weiteren Einflussfaktoren die Wirkung von Sr^{2+} -Ionen auf hMSC und Monozyten/Osteoklasten zu analysieren.
- Weiterhin wurde mit Hilfe eines *indirekten Versuchsaufbaus* die zelluläre Reaktion auf von den Zementen verursachte Veränderungen des Zellkulturmediums (Ionenkonzentrationen, pH-Veränderung etc.) bestimmt³.
- Schließlich wurden Zellen in *direktem Materialkontakt* auf Zementplättchen kultiviert, um sämtliche Einflüsse der (modifizierten) Zemente, wie Ionenfreisetzung und -bindung, pH-Variation, Oberflächenrauheit etc. zeitgleich zu studieren.

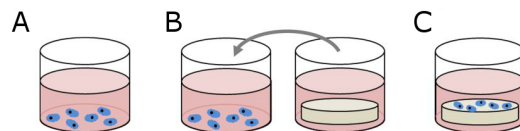


Abb. 3.5: 3-stufiger Aufbau der Zellkulturversuche: Zugabe von SrCl_2 zum Zellkulturmedium (A), indirekte Kultur (B) und direkte Kultivierung von hMSC bzw. Monozyten/Osteoklasten auf Zementplättchen (C).

3.4.1 Einfluss von Sr^{2+} auf Osteogenese und Osteoklastogenese

hMSC bzw. humane Monozyten wurden in OS^+ und OS^- bzw. in OC^+ -Medium auf Polystyrol kultiviert. Es wurden jeweils $2 \cdot 10^4$ hMSC bzw. $4 \cdot 10^5$ Monozyten in 48 well-Platten (Nunc) ausgesät und über 7, 14 und 21 Tage bzw. 6, 9 und 16 Tage unter Zugabe von bis zu 10 mM SrCl_2 kultiviert. SrCl_2 (Sigma-Aldrich) wurde dazu in einer Konzentration von 100 mM in α -MEM gelöst, steril filtriert (0,22 μm Spritzenfilter, TPP) und daraus Verdünnungen von 0,001; 0,01; 0,1; 0,5, 1 und 10 mM hergestellt.

³ Indirekte Versuche wurden nur bzgl. der Osteogenese durchgeführt.

3.4.2 Indirekte Zellkultur

Im Fall der indirekten Zellkultur wurden Zellen (hMSC: $2 \cdot 10^4$ /well) in 48 well-Platten ausgesät und 24 h inkubiert (350 μ l OS^- -Medium pro well). Zeitgleich wurden CPC und Strontium-modifizierte Zementplättchen ($d = 1$ mm, $\varnothing = 10$ mm) in OS^+ und OS^- bzw. in OC^+ -Medium eingelegt (350 μ l/well). Beginnend mit Tag 1 wurde alle 3–4 Tage das auf den Zementen konditionierte Medium auf die auf Polystyrol kultivierten Zellen übertragen und durch frisches Medium ersetzt. Die Kultur erfolgte über 7, 14 und 21 Tage.

3.4.3 Direkte Zellkultur

Vor der Besiedelung mit Zellen wurden die Zementplättchen ($d = 1$ mm, $\varnothing = 10$ mm) für 3 Tage in je 350 μ l α MEM (mit FCS und Antibiotika) äquilibriert, um den von den Zementen initial verursachten Abfall des pH-Wertes auszugleichen und so die Besiedelungseffizienz zu erhöhen.

Es wurden $2 \cdot 10^4$ (hMSC) bzw. $4 \cdot 10^5$ (Monozyten) Zellen pro Zementplättchen ($d = 10$ mm, 48 well-Platte) verwendet und mit 350 μ l/well Medium (OS^+ , OS^- bzw. OC^+ -Medium) über 7, 14 und 21 Tage kultiviert. Im Fall der für die Isolierung von RNA zur Genexpressionsanalyse vorgesehenen Proben wurden $4 \cdot 10^4$ hMSC pro Plättchen verwendet, um die RNA-Ausbeute zu erhöhen.

3.5 Biologische Analysenmethoden

3.5.1 Biochemische und molekularbiologische Analysen der Osteogenese

Zur Bestimmung der Proliferation und osteogenen Differenzierung von hMSC wurden verschiedene biochemische Methoden verwendet: die Proliferation und Adhäsion (nur an Tag 1) wurden anhand der Zellzahl zu verschiedenen Zeitpunkten durch Bestimmung der Aktivität der intrazellulären Lactatdehydrogenase (LDH) und des DNA-Gehalts im Zelllysat bestimmt. Im Fall der direkten Kultivierung von hMSC auf Zementen, die eine hohe Bindungskapazität für DNA besitzen, wurde lediglich die LDH-Aktivität herangezogen. Die osteogene Differenzierung wurde anhand der spezifischen

Tab. 3.2: Reagenzien für die biochemische Analyse.

Reagenz	Hersteller
CytoTox 96 [®] Assay	Promega
Diethanolamin	Sigma-Aldrich
Ethylenglykol Monomethylether	Fluka
MgCl ₂	Fluka
NaOH	Roth
Naphtol-AS-BI-phosphat	Sigma-Aldrich
Natriumacetat	Roth
NaCl	Sigma-Aldrich
Nonident P40 (NP40)	Fluka
para-Nitrophenol (pNP)	Sigma-Aldrich
para-Nitrophenylacetat (100 mM in Aceton)	Sigma-Aldrich
para-Nitrophenylphosphat (pNPP)	Sigma-Aldrich
Quant-iT [™] PicoGreen [®] dsDNA Reagent	Life Technologies / Invitrogen
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)	Roth
Triton [™] X-100	Sigma-Aldrich

Aktivität der Alkalischen Phosphatase (ALP), eines für die osteogene Differenzierung charakteristischen Enzyms, bestimmt. Darüber hinaus wurde die Expression zweier charakteristischer Marker der osteoblastären Differenzierung, ALP und *bone sialoprotein* (BSP), mit Hilfe einer Genexpressionsanalyse (quantitative PCR) analysiert. Die dabei verwendeten Reagenzien sind in Tabelle 3.2 zusammengefasst.

Zellyse

Die Aktivität der untersuchten Enzyme bzw. der Gehalt an DNA wurden im Zelllysat bestimmt. Dazu wurden die Zellen bzw. zellbesiedelten Zementplättchen am jeweiligen Analysentag zunächst bei -80 °C eingefroren. Zur weiteren Analyse wurden die Proben nach dem Auftauen mit Lysepuffer (siehe Tab. 3.3, 300 µl/Probe) versetzt und 40 min auf Eis und anschließend nochmals 10 min im gekühlten Ultraschallbad inkubiert.

Tab. 3.3: Lösungen und Puffer für die biochemische Analyse.

Lösung/Puffer	Zusammensetzung
Lysepuffer	1 % Triton X-100 in PBS
PicoGreen Färbelösung	Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA Reagent, 1:800 in 10 mM TRIS HCl 1 mM EDTA
ALP-Substratlösung	1 mg/ml p-NPP in 100 mM Diethanolamin, pH 9.8 1% Triton X-100 1 mM MgCl ₂
TRAP-Substratlösung	2,5 mM Naphtol-AS-BI-phosphat 100 mM Natriumacetat 50 mM Natriumtartrat 2 % NP40 1 % Ethylenglykol Monomethylether
TRAP-Stopplösung	0,1 M NaOH 0,05 % NP40
CAII Substratlösung	2 mM para-Nitrophenylacetat 12,5 mM TRIS 75 mM NaCl

Bestimmung des DNA-Gehalts

Die Bestimmung der Zellzahl anhand des DNA-Gehalts (nur im Fall der hMSC, vgl. Kap. 4.3) erfolgte mit Hilfe der *PicoGreen*-Methode. Dazu wurden 10 µl Lysat mit 190 µl PicoGreen-Färbelösung (Tab. 3.3) 5 min bei Raumtemperatur in einer schwarzen 96 well-Platte (Nunc) inkubiert und anschließend die Fluoreszenz bei $\lambda = 535$ nm (bei Anregung mit $\lambda = 485$ nm) gemessen (infinite M200 PRO, Tecan). Anhand einer am Tag des jeweiligen Versuchsstarts vorbereiteten und nach 24 h eingefrorenen Kalibrierreihe mit 0,5; 1; 2; 4; 8 und $16 \cdot 10^4$ Zellen, die während der Messung mitgeführt wurden, konnte eine Kalibriergerade konstruiert und so anhand des DNA-Gehalts auf die Zellzahl rückgeschlossen werden.

Bestimmung der Aktivität der Lactatdehydrogenase (LDH)

Bei der LDH handelt es sich um ein intrazelluläres Enzym, dessen Aktivität unter der Annahme, dass diese über den Zellzyklus hinweg weitgehend stabil bleibt, als Messgröße zur Abschätzung der Zellzahl herangezogen werden kann. Eine quantitative Bestimmung der Enzymaktivität ist mit Hilfe des CytoTox 96[®] Assay Kits möglich [101]. Durch LDH wird Lactat zu Pyruvat umgesetzt, wobei zugleich NAD^+ zu NADH reduziert wird, das wiederum die Umsetzung von Iodonitrotetrazoliumchlorid in rotes Formazan durch das Enzym Diaphorase ermöglicht. Die von der Enzymaktivität abhängige Farbänderung ist somit proportional zur Zellzahl und kann anhand der Adsorption bei 490 nm photospektrometrisch quantifiziert werden.

Zur Bestimmung der LDH-Aktivität wurden 50 µl Lysat (bei höheren Zellzahlen mit Lysepuffer verdünnt) für 30 min bei Raumtemperatur mit 50 µl LDH-Substratlösung im Dunkeln inkubiert, die enzymatische Reaktion anschließend mit 50 µl LDH-Stopp-lösung gestoppt und die Absorption bei $\lambda = 490 \text{ nm}$ bestimmt (infinite M200 PRO, Tecan). Anhand einer aus Lysaten definierter Zellzahlen bestehenden Kalibriergeraden (vgl. Bestimmung des DNA-Gehalts) wurde aus der Absorption auf die Zellzahl rückgeschlossen.

Bestimmung der Aktivität der Alkalischen Phosphatase (ALP)

Die ALP wird von Osteoblasten als eines der Schlüsselenzyme der Mineralisierung der Knochenmatrix exprimiert und wird als früher Marker der osteogenen Differenzierung angesehen [102]. Die Aktivität der ALP lässt sich anhand der pNPP-Methode quantitativ bestimmen: ALP setzt para-Nitrophenylphosphat (pNPP) in para-Nitrophenol (pNP) um, welches durch Zugabe von NaOH zu para-Nitrophenolat reagiert, dessen intensive Gelbfärbung photospektrometrisch quantifiziert werden kann.

Es wurden jeweils 20 µl des Lysats mit 100 µl ALP-Substratlösung (Tab. 3.3) für 30 min bei 37 °C inkubiert und die Reaktion mit 80 µl 1 M NaOH gestoppt. Anschließend wurde die Absorption bei $\lambda = 405 \text{ nm}$ bestimmt (infinite M200 PRO, Tecan), mit Hilfe einer pNP Kalibriergerade die Menge an umgesetztem pNPP berechnet und durch Korrelation mit der Zellzahl (ermittelt anhand der LDH-Aktivität) die spezifische ALP-Aktivität berechnet.

RNA-Isolation

Die Gesamt-RNA der auf den Zementen für 7, 14 und 21 Tage kultivierten Zellen wurde unter Verwendung des *RNeasy Mini-Kits* (Quiagen) entsprechend der Herstellerangaben isoliert. Die Lyse der Zellproben erfolgte in 300 µl des im Kit enthaltenen Lysepuffers pro Probe innerhalb von 5 min. Die gesammelten Lysate wurden mit je 300 µl 70 %-igem Ethanol gemischt, die enthaltene RNA mit Hilfe von *RNeasy mini columns* gereinigt und mit 50 µl RNase-freiem Wasser (Roth) eluiert. Die RNA-Konzentration im Eluat wurde mittels UV-Spektrometrie (NanoDrop 2000c, Thermo Scientific) bestimmt.

Reverse Transkription und quantitative *real-time* PCR

Die Genexpression ausgewählter osteogener Marker (ALP, BSP II) wurde mittels *real-time* PCR auf mRNA-Ebene quantifiziert. Als endogenes Referenzgen diente die Glyceraldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH).

Zunächst wurde die RNA unter Verwendung der *Superscript® II Reverse Transcriptase* (Invitrogen) in cDNA umgeschrieben. Dies erfolgte in einem 20 µl-Ansatz, der neben 40 ng Gesamt-RNA, den entsprechenden Reaktionspuffer (*First strand buffer*), 12,5 ng/µl *random hexamers* (MWG Biotech), 0,5 mM dNTPs (Invitrogen), 5 mM MgCl₂, 10 mM DTT und 40 U *RNase Inhibitor RNase OUT* (Invitrogen) enthielt. Zuerst wurde die RNA mit den *random hexamers* und dNTPs für 5 min bei 65 °C inkubiert, anschließend mit den restlichen Bestandteilen gemischt und der Ansatz nach Zugabe von 200 U *Superscript II* für 50 min bei 42 °C und 15 min bei 70 °C im Thermocycler inkubiert.

2 µl des cDNA-Ansatzes wurden anschließend als Templat für die auf der TaqMan[™]-Technologie (Applied Biosystems) basierenden *real-time*-PCR eingesetzt. Neben der jeweiligen cDNA enthielt der Reaktionsmix die genspezifischen TaqMan[®] *Gene Expression Assays* (siehe Tab. 3.4) mit entsprechenden Primern und FAM-markierten Sonden (Life Technologies) sowie den TaqMan[®] *Fast Universal PCR MasterMix* (Life Technologies). Die *real-time*-PCR erfolgte mit Hilfe des 7500 Real Time PCR Fast Systems (Applied Biosystems, Life Technologies) mit einem initialen Zyklus von 20 s bei 95 °C und anschließend 40 Zyklen mit jeweils 3 s bei 95 °C und 30 s bei 60 °C.

Die relative Quantifizierung der Genexpression osteogener Marker (ALP, BSP II) erfolgte für jede Probe anhand der ermittelten Ct-Werte (*cycle threshold*) durch Normierung auf das endogene Referenzgen GAPDH (ΔC_t , siehe Gl. 3.5). Die $\Delta\Delta C_t$ -Methode ($2^{-\Delta\Delta C_t}$,

Tab. 3.4: Übersicht der verwendeten TaqManTM-Assays.

Gen	Assay ID	Referenzsequenz	Location	Länge d. Amplicons
ALP	Hs01029144_m1	NM_000478.4	1056	79
BSPII	Hs00173720_m1	NM_004967.3	283	95
GAPDH	Hs99999905_m1	NM_002046.4	229	122

siehe Gl. 3.6 und 3.7) wurde angewendet, um die relative Änderung der Expression gegenüber der CPC-Probe an Tag 1 zu berechnen:

$$Ct_{\text{Zielgen}} - Ct_{\text{Referenzgen (GAPDH)}} = \Delta Ct_{\text{Probe}} \quad (3.5)$$

$$\Delta Ct_{\text{Probe}} - \Delta Ct_{\text{Referenz (CPC)}} = \Delta \Delta Ct_{\text{Probe}} \quad (3.6)$$

$$2^{-\Delta \Delta Ct_{\text{Probe}}} = \text{n-fache Expression} \quad (3.7)$$

Die quantitative *real-time* PCR wurde freundlicherweise von Sophie Brüggemeier durchgeführt.

3.5.2 Biochemische Analysen der Osteoklastogenese

Eine Bestimmung der Zellzahl anhand des DNA-Gehalts ist im Fall der Monozyten bzw. Osteoklasten nicht möglich, da während der Osteoklastogenese mononukleäre Monozyten zu multinukleären Osteoklasten fusionieren und der DNA-Gehalt somit nicht mehr mit der Zellzahl korreliert. Dennoch wurde der DNA-Gehalt in Lysaten aus Osteoklastenkulturen bestimmt, da 1.) ein Abfall des DNA-Gehalts auf ein Absterben von Zellen hindeutet, und 2.) ein Anstieg als Hinweis auf das Vorhandensein anderer, proliferationsfähiger Zellen schließen lässt (Lyse und DNA-Quantifizierung vgl. Kap. 3.5.1). Die Osteoklastogenese wurde anhand der Aktivität der tartratresistenten sauren Phosphatase (TRAP) sowie der Carbonanhydrase II (CAII) bestimmt, zweier für die osteoklastäre Aktivität charakteristischer Enzyme.

Bestimmung der Aktivität der tartratresistenten sauren Phosphatase (TRAP)

Die TRAP ist ein für Osteoklasten sowie Makrophagen charakteristisches Enzym und spielt eine Rolle in der osteoklastären Resorption des Knochens, indem es am Abbau

verschiedener Knochenmatrixproteine beteiligt ist [19, 103]. Ihre Aktivität stellt somit ein Maß für die Resorptionsfähigkeit bzw. die Osteoklastogenese dar.

Die TRAP-Aktivität wurde mit Hilfe der enzymatischen Umsetzung von Naphtol-AS-BI-phosphat ermittelt. Das nichtfluoreszierende Substrat wird durch Abspaltung seiner Phosphatgruppe in das fluoreszierende Naphtol-AS-BI umgewandelt⁴. Dazu wurden 10 µl Lysat mit 50 µl TRAP-Substratlösung (Tab. 3.3) für 30 min in einer schwarzen 96 well-Platte bei 37 °C inkubiert. Nach Abstoppen mit 150 µl TRAP-Stopplösung wurde die Fluoreszenz der Proben bestimmt und mit Hilfe einer TRAP-Kalibriergerade (Bone TRAP®) die Enzymaktivität ausgewertet (infinite M200 PRO, Tecan).

Bestimmung der Aktivität der Carbonanhydrase II (CAII)

Bei der Carbonanhydrase handelt es sich um ein zytosolisches Enzym, das die Hydratation von CO₂ zu Hydrogencarbonat unter Bildung von Protonen katalysiert. Die CAII ist ein charakteristisches Enzym der Osteoklasten, welche die Protonen über Protonenpumpen der *ruffled border* in den Resorptionsraum schleusen, wo sie zu einer Absenkung des pH-Werts und der Auflösung des mineralischen Knochenanteils führen [11, 103]. Ebenso katalysiert die CAII die Reaktion von para-Nitrophenylacetat zu pNP, wodurch ihre Aktivität photospektrometrisch quantifiziert werden kann.

Zur Analyse wurden 50 µl Lysat mit 50 µl CAII-Substratlösung (Tab. 3.3) gemischt und die Absorption ($\lambda = 400$ nm, infinite M200 PRO, Tecan) der Lösung für 5 min gemessen (Kinetikmessung). Die Enzymaktivität wurde anschließend anhand einer pNP-Kalibriergerade (vgl. Kap. 3.5.1) berechnet.

3.6 Mikroskopische Untersuchungen

Zellmorphologische Untersuchungen an Osteoblasten sowie Osteoklasten wurden sowohl mit Hilfe der konfokalen Laserscanning-Mikroskopie (Leica TCS SP5 Fluoreszenzmikroskop) als auch der Rasterelektronenmikroskopie (REM, Phillips ESEM XL30) durchgeführt. Die verwendeten Reagenzien sind in Tabelle 3.5 aufgeführt. Zur Charakterisierung der Zementoberflächen wurde darüber hinaus ein am REM montiertes System zur Energie-dispersiven Röntgenstreuungsmessung (EDX, EDAX Inc.) verwendet.

⁴ Wellenlängen: $\lambda_{\text{Anregung}} = 405$ nm, $\lambda_{\text{Emission}} = 520$ nm.

3.6.1 Fluoreszenzmikroskopie

Fixierung biologischer Proben für die Fluoreszenzmikroskopie

Zum Zeitpunkt der Untersuchung wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und anschließend in 3,7 %-iger Formaldehydlösung (in PBS) für 15 min fixiert. Die Lagerung der fixierten Proben erfolgte in 1 %-iger Formaldehydlösung bei 4 °C.

Tab. 3.5: Reagenzien und Lösungen zur Probenpräparation für die Mikroskopie.

Reagenz	Hersteller
Formaldehydlösung, 37 %	Merck
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich
Triton TM X-100	Sigma-Aldrich
4',6-Diamidin-2-phenylindol Dihydrochlorid (DAPI)	Invitrogen
AlexaFluor [®] 488 Phalloidin	Invitrogen

Fluoreszenzfärbung von Zellkern und Cytoskelett

Zunächst wurden die fixierten Proben dreimal mit PBS gewaschen und anschließend die Zellen mit 0,2 % Triton X100 in PBS für 3 min permeabilisiert. Nach fünfmaligem Waschen mit PBS wurden die Proben für 60 min in 2 %-iger BSA-Lösung inkubiert, um später eine unspezifische Bindung des Farbstoffs zu minimieren.

Die Färbung der Zellkerne (DAPI) sowie des Cytoskeletts (Aktin-Fasern, Phalloidin) erfolgte durch 30-minütige Inkubation in 2 %-iger BSA-Lösung mit 25 µl/ml AlexaFluor 488[®] Phalloidin und 20 ng/ml DAPI. Anschließend wurden die Proben erneut dreimal mit PBS gewaschen.

3.6.2 Rasterelektronenmikroskopie (REM)

Zur REM-Untersuchung zellbesiedelter Proben wurden diese nach dem Fixieren in Formaldehyd (vgl. Kap. 3.6.1) zunächst mit Hilfe einer Ethanolreihe entwässert und anschließend kritisch-Punkt getrocknet (CPD 030, Bal-Tec). Die Proben wurden mit Kohlenstoff bedampft und bei niedriger Beschleunigungsspannung (1,5 kV) mikroskopiert (siehe Kap. 3.2.3).

3.7 Statistik

Alle materialwissenschaftlichen Untersuchungen wurden mit $n = 6$ (Abbindeverhalten, mechanische Charakterisierung, Dichte- und Porositätsmessung) bzw. $n = 3$ Proben (Ionenfreisetzung) durchgeführt. Für zellbiologische Analysen wurden je Versuch $n = 3$ Proben verwendet und die Experimente zur Osteogenese auf Sr-modifizierten Zementen mit Zellen von 3 (hMSC) bzw. 2 (Monozyten) Spendern durchgeführt. Die Ergebnisse der einzelnen Messungen wurden als Mittelwerte \pm Standardabweichung angegeben. Die Daten wurden statistisch mit Hilfe der Ein- bzw. Zwei-Wege ANOVA (Analysis of Variance) analysiert und mittels des Tukey-Tests mit einer Signifikanzebene von $p = 0,05$ auf statistische Unterschiede hin untersucht (OriginPro 8.5.0G SR0, Origin Lab. Corp.).

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Materialwissenschaftliche Charakterisierung der Zemente

4.1.1 Eigenschaften der Zementpasten und Abbindeverhalten

Grundlage für die in dieser Arbeit entwickelten, Strontium-haltigen Calciumphosphat-Knochenzemente war der *biocement 1.0* der Firma InnoTERE GmbH (Radebeul). Dieser entspricht in seiner Zusammensetzung weitgehend dem von Driessens und Mitarbeitern beschriebenen *Biocement D* [104]. Es handelt sich dabei um ein sog. Pulver-Flüssigkeits-Zementsystem, das kurz vor der Anwendung aus dem Precursor-Pulver und einer Flüssigkeit (hier: 4 %-ige Na_2HPO_4 -Lösung in Wasser) angerührt wird (vgl. Kap. 3.1). Die Eigenschaften der dabei entstehenden Zementpaste hängen entscheidend vom gewählten Flüssigkeit/Pulver-Verhältnis ab (l/p-Verhältnis).

Strontium-modifizierte Varianten dieses Zements wurden entweder durch Beimischung von SrCO_3 zu o. g. Precursor-Pulver (*A-Typ*), durch Zugabe von SrCO_3 und wasserfreiem Calciumhydrogenphosphat (DCPA, *B-Typ*) oder durch teilweise bzw. vollständige Substitution des im Precursor-Pulver enthaltenen CaCO_3 durch SrCO_3 (*S-Typ*) hergestellt. Dadurch ergaben sich prinzipielle Unterschiede in der Zusammensetzung der modifizierten Zemente: während im Fall der B- und S-Typ-Modifikation das (Ca+Sr)/P-Verhältnis konstant blieb ($(\text{Ca}+\text{Sr})/\text{P} = 1,514$; vgl. Tab. 3.1), erhöhte sich dieses für A-Typ-modifizierte Zemente. Diese Änderung im Verhältnis der für die Zementierungsreaktion zur Verfügung stehenden Ionen ist eine mögliche Ursache für die im Folgenden diskutierten Eigenschaften der modifizierten Zemente.

Aus allen Zementvarianten ließen sich durch Anrühren mit 4 %-iger Na_2HPO_4 -Lösung (in Wasser) formbare Zementpasten herstellen, die sich jedoch in ihren Eigenschaften unterschieden: während der unmodifizierte CPC und A-Typ-Varianten der Zemente

mit l/p-Verhältnissen von 350 bis 500 $\mu\text{l/g}$ verarbeitbar waren und zu festen Zementen abbinden konnten, führten l/p-Verhältnisse $\geq 400 \mu\text{l/g}$ im Fall der S-Typ-modifizierten Zemente zu nicht-abbindenden Pasten ($t_f > 60 \text{ min}$).

In Tabelle 4.1 sind die mittels Gillmore-Nadel bestimmten Abbindezeiten für die hier untersuchten Zemente bei drei unterschiedlichen l/p-Verhältnissen dargestellt. Es wird ersichtlich, dass die Beimischung von SrCO_3 zu keiner wesentlichen Veränderung der Abbindezeit führte, wohingegen sowohl für B- als auch S-Typ-modifizierte Zemente deutlich längere initiale (t_i) und finale Abbindezeiten (t_f) gemessen wurden. Bei erhöhtem l/p-Verhältnis (400–500 $\mu\text{l/g}$) lag die initiale Abbindezeit der S-Typ-Zemente bereits deutlich oberhalb 15 min. Dies entspricht insofern der Erwartung, als ein höheres l/p-Verhältnis generell zu einer „flüssigeren“ Paste führt, und sich die Abbindezeit entsprechend verlängert [105]. Damit überschreiten die Zemente jedoch bei diesem l/p-Verhältnis das für Knochenzemente vorgeschlagene Verarbeitungsintervall von $3 \leq t_i \leq 8 \text{ min}$ [106, 107]. Dieses beruht auf der Überlegung, dass t_i lang genug sein muss, um die Zementpaste während der chirurgischen Versorgung in den Knochendefekts zu modellieren. Außerdem soll die Paste innerhalb einer hinreichend kurzen Zeit (t_f) ausreichend ausgehärtet sein, um das Schließen der Operationswunde zu erlauben. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde für S-Typ-modifizierte Zemente l/p = 350 $\mu\text{l/g}$, für CPC sowie A- und B-Typ-Zemente l/p = 500 $\mu\text{l/g}$ festgelegt.

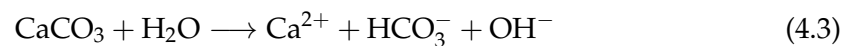
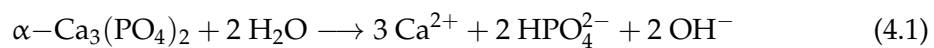
Eine mögliche Erklärung für das Ansteigen der Abbindezeit bei B- und S-Typ-modifizierten Zementen ist die im Vergleich zu CaCO_3 geringere Löslichkeit von SrCO_3 (vgl. Tab. 2.3). Entsprechend stehen die für die Zementierungsreaktion notwendigen Ionen nach dem Anrühren der Zementpaste zunächst nur eingeschränkt zur Verfügung. Da die zuzugebende Flüssigkeitsmenge anhand der Masse des eingesetzten Zement-Precursorpulvers berechnet wurde, steht aufgrund des höheren Molekulargewichts des Strontiums (87,62 g/mol gegenüber 40,08 g/mol für Calcium) zudem für die direkt an der Reaktion beteiligten Komponenten eine größere Flüssigkeitsmenge zur Verfügung, was einer zusätzlichen Erhöhung des l/p-Verhältnisses entspricht.

Tab. 4.1: Initiale (t_i) und finale (t_f) Abbindezeiten der untersuchten Zemente für verschiedene l/p-Verhältnisse.

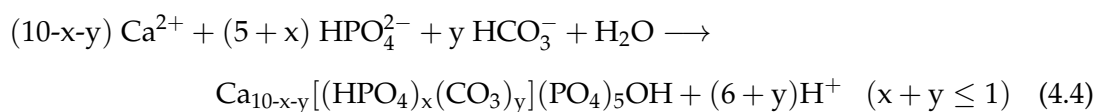
Material	l/p = 350 µl/g		l/p = 400 µl/g		l/p = 500 µl/g	
	t_i [min]	t_f [min]	t_i [min]	t_f [min]	t_i [min]	t_f [min]
CPC	7,5 ± 0,5	28,0 ± 1,5	10,0 ± 0,5	29,0 ± 3,0	12,0 ± 0,5	32,0 ± 2,0
A5	7,5 ± 1,0	26,5 ± 2,0	9,5 ± 1,0	28,5 ± 2,5	11,0 ± 1,5	29,0 ± 1,5
A10	6,5 ± 1,0	25,0 ± 1,5	9,5 ± 0,5	27,0 ± 2,5	11,0 ± 0,5	28,0 ± 2,5
B5	10,5 ± 1,5	31,0 ± 1,0	12,5 ± 1,5	35,5 ± 2,5	15,0 ± 1,0	32,5 ± 1,5
B10	11,5 ± 2,0	33,5 ± 1,5	13,0 ± 1,0	38,0 ± 3,0	15,5 ± 2,0	35,0 ± 2,5
S50	12,5 ± 1,5	30,5 ± 2,5	> 15,0	-	> 15,0	-
S100	13,0 ± 1,5	34,0 ± 2,0	> 15,0	-	> 15,0	-

4.1.2 Zementierungsreaktion und Aushärten der Zemente

Wie alle Calciumphosphatzemente bindet auch der verwendete *biocement 1.0* durch Lösungs- und Wiederausscheidungsreaktionen ab, wobei sich die Zementierungsreaktion in drei Abschnitte gliedern lässt: (I) Lösung der Precursorkomponenten (Gl. 4.1-4.5), (II) Keim- und Kristallitbildung sowie Kristallwachstum und somit zunehmende Verfestigung des Zements (III).



Die fortschreitende Umwandlung des CPC zu Hydroxylapatit während der Auslagerung in wasserhaltiger Atmosphäre unter Verbrauch der Precursorkomponenten (Gl. 4.4) ist in Abbildung 4.1 A anhand der im Verlauf der Abbindereaktion aufgenommenen XRD-Spektren gut zu erkennen.



Die Peakhöhen der den Ausgangsphasen α -TCP, DCPD und CaCO_3 zugeordneten Reflexe nahmen im Laufe der Zeit ab, während zunehmend stärkere HA-Peaks aufgenommen wurden. Dies wurde durch eine (semi-)quantitative Auswertung der XRD-Spektren mittels Rietveld-Analyse bestätigt, mit deren Hilfe die Phasengehalte an DCPD, α -TCP, CaCO_3 und HA an den jeweiligen Zeitpunkten bestimmt wurden (Abb. 4.1 B). Nach 6 h war die Umwandlung in HA bereits zu rund 60 % abgeschlossen und erreichte nach 7 Tagen einen Umsetzungsgrad von ca. 70 %. Auffällig ist, dass die Umsetzung vorwiegend auf Kosten von α -TCP ablief, während auch nach 7 Tagen noch rund 17 % DCPD (von anfänglich 27 %) im Zement enthalten waren.

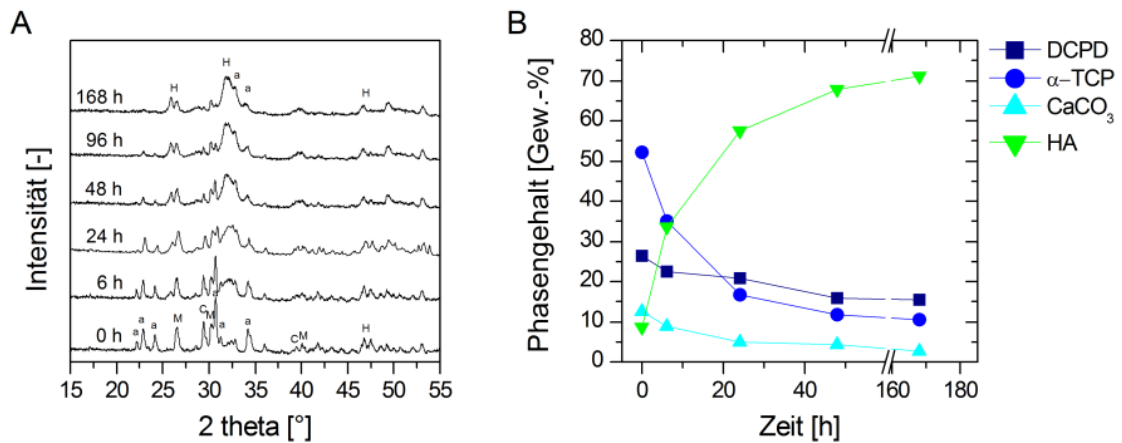
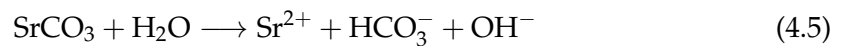


Abb. 4.1: XRD-Spektren (A) und relative Phasengehalte (B) während der Abbindereaktion von CPC in wasserhaltiger Atmosphäre (a: α -TCP, H: Hydroxylapatit, C: CaCO_3 , M: DCPA).

Auch die Strontium-modifizierten Zemente binden über vergleichbare Lösungs- und Wiederausscheidungsreaktionen ab, jedoch steht hier SrCO_3 als zusätzliche Reaktionskomponente zur Verfügung und liefert lt. Formel 4.5 Strontium- und zusätzliche Hydrogencarbonat-Ionen:



Im Fall der A-Typ-Zemente entsteht dadurch ein Überschuss an Sr^{2+} und HCO_3^- . Wie anhand von XRD-Spektren dieser Zemente ersichtlich, kam es hier ebenfalls zur Umsetzung der Ausgangsphasen zu HA. Daneben wurden jedoch auch nach 4 Tagen noch unverändert hohe SrCO_3 -Peaks beobachtet (Abb. 4.2). Folglich war SrCO_3 nicht bzw. nur eingeschränkt an der Zementierungsreaktion beteiligt, und es ist somit kein Einbau

von aus dem SrCO_3 gelösten Sr^{2+} in die Zementmatrix zu erwarten. Vielmehr lag SrCO_3 auch im abgebundenen Zement als separate Phase vor.

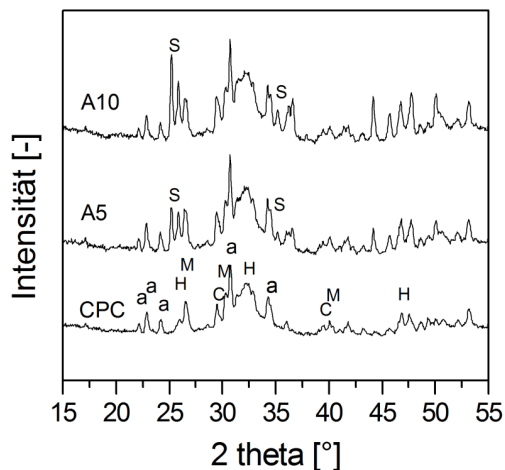
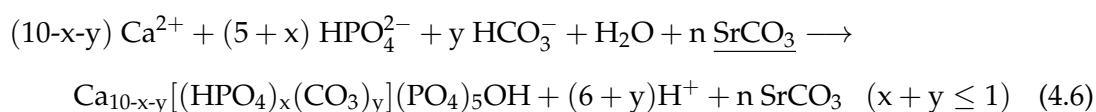


Abb. 4.2: XRD-Spektren von CPC sowie A5- und A10-Zementen nach 4-tägiger Auslagerung (a: α -TCP, H: Hydroxylapatit, C: CaCO_3 , M: DCPA, S: SrCO_3).

Ein möglicher Grund dafür ist wiederum die im Vergleich zu CaCO_3 geringere Löslichkeit von SrCO_3 (vgl. Tab. 2.3) sowie die höhere Partikelgröße und damit geringere spezifische Oberfläche des SrCO_3 , das lediglich manuell eingemischt und nicht mit den anderen Precursorkomponenten vermahlen wurde. Darüber hinaus sind durch die sonstigen Precursorkomponenten ausreichend zweiwertige Kationen (Ca^{2+}) für die Apatitbildung vorhanden, so dass diese wie in Gleichung 4.4 beschrieben abläuft, während SrCO_3 unverändert verbleibt:



Dies wird weiter gestützt durch die Ergebnisse der Infrarotspektroskopie (Abb. 4.3): Das Übersichtsspektrum zeigt zunächst für alle untersuchten Zemente adsorbiertes Wasser (erkennbar an der breiten Schwingung bei $\tilde{\nu} \approx 3500 \text{ cm}^{-1}$). In der Vergrößerung sind die HA-typischen Valenzschwingungsbanden (ν_1 -P-O und ν_3 -P-O) und Deformationsschwingungsbanden (ν_4 -P-O) markiert. Ebenfalls sind die für Carbonat charakteristischen Schwingungsbanden im Bereich $1460\text{--}1400 \text{ cm}^{-1}$ (ν_3 -C-O) zu erkennen sowie die typische ν -C-O Streckschwingung bei $\tilde{\nu} \approx 860 \text{ cm}^{-1}$. Allerdings ist eine Zuord-

nung zu CaCO_3 oder SrCO_3 aufgrund der Überlagerung der Banden nicht möglich ($\tilde{\nu} \approx 860 \text{ cm}^{-1}$ für CaCO_3 [108], $\tilde{\nu} \approx 856 \text{ cm}^{-1}$ für SrCO_3 [109]) – gleichzeitig bildet die für A-Typ-Zemente gegenüber CPC stärkere Bande in diesem Wellenzahlbereich die Beimischung zusätzlichen Carbonats ab. Da bereits mittels XRD die Abnahme des CaCO_3 binnen 7 Tagen gezeigt wurde (vgl. Abb. 4.1) weisen die für A5 und A10 aufgenommenen Spektren folglich auf das Vorhandensein von SrCO_3 im ausgehärteten A-Typ-modifizierten Zement hin.

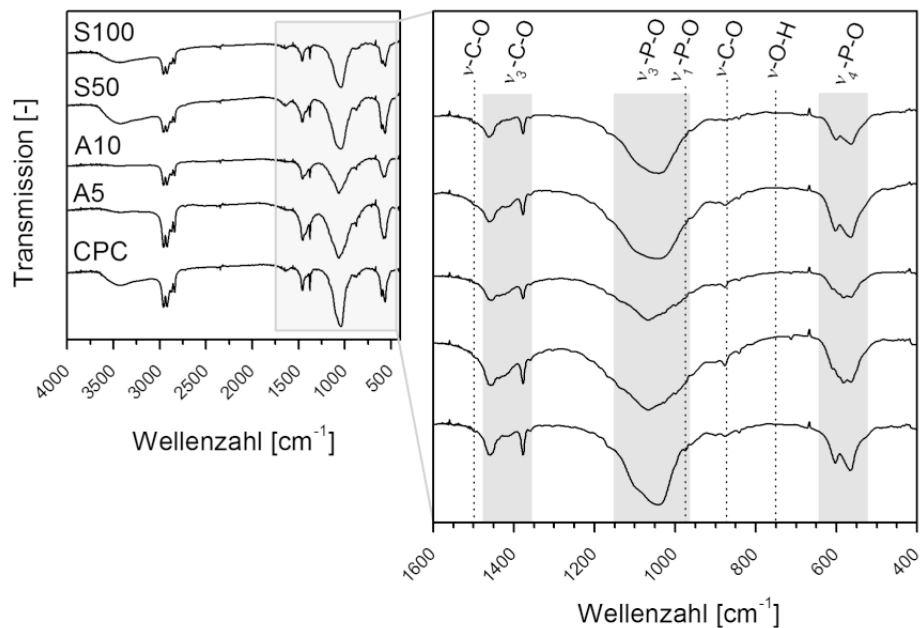


Abb. 4.3: FTIR-Spektren von CPC und Sr-modifizierten Zementen nach 7-tägiger Auslagerung in Wasser.

Um das durch die Zugabe von SrCO_3 entstandene Ungleichgewicht der Reaktionskomponenten auszugleichen, wurde B-Typ-Zementen zusätzliches DCPA beigemischt. Jedoch führte die nun ausgeglichene Stöchiometrie nicht zur Bildung einer stabilen Zementmatrix, wie anhand der mechanischen Charakterisierung deutlich wurde (siehe Kap. 4.1.6). Möglicherweise verhinderte die Korngröße des beigemischten DCPA die angestrebte Reaktion: wie auch SrCO_3 wurde dieses lediglich manuell mit dem Precursor-Pulver vermahlen und lag in entsprechend großen, undefiniert geformten Kristalliten vor. Bei weiteren Untersuchungen wurde die B-Typ-Modifikation daher nicht mehr berücksichtigt.

Im Gegensatz zu A-Typ-Zementen ist in an S100-Proben aufgenommenen, zeitlich aufgelösten XRD-Spektren eine graduelle Abnahme der SrCO_3 -Reflexe erkennbar (Abb. 4.4 A), vergleichbar der Abnahme der Signale des CaCO_3 im Fall des unmodifizierten CPC.

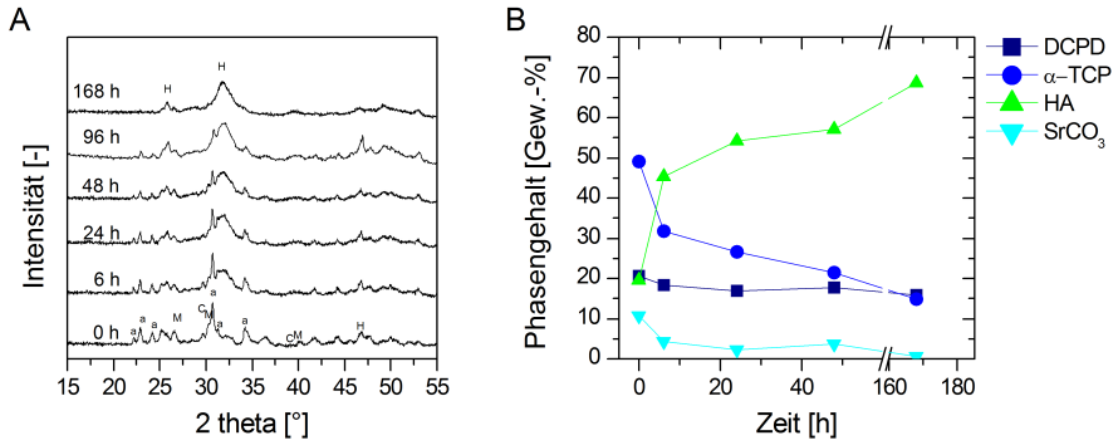
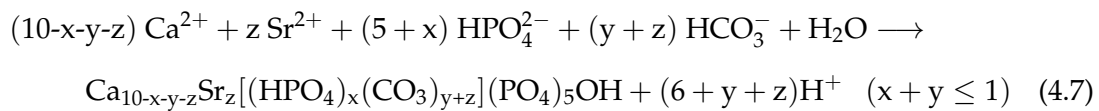


Abb. 4.4: XRD-Spektren (A) und relative Phasengehalte (B) während der Abbindereaktion von S100 in wasserhaltiger Atmosphäre (a: α-TCP, H: Hydroxylapatit, C: CaCO_3 , M: DCPA, S: SrCO_3).

Auch anhand der mittels Rietveld-Analyse ermittelten Phasengehalte (Fig. 4.4 B) wird deutlich, dass die Zementierungsreaktion hier unter Verbrauch des SrCO_3 stattfindet. Dies ist auch anhand der in Abbildung 4.3 gezeigten FTIR-Spektren zu erkennen: die bei $\tilde{\nu} \approx 860 \text{ cm}^{-1}$ liegende $\nu\text{-C-O}$ Streckschwingung ist im Fall der S-Typ-Proben nur schwach ausgeprägt (vergleichbar mit CPC), was für den Verbrauch der Carbonat-Phase (SrCO_3 bzw. CaCO_3) spricht. Nach 7 Tagen schließlich ist mit ca. 70 % ein mit CPC vergleichbarer Umsetzungsgrad in die Apatit-Phase erreicht. Da weder mittels XRD noch im FTIR neu gebildete, Sr-haltige Phasen detektiert wurden, kann davon ausgegangen werden, dass es zu einem Einbau von Sr^{2+} -Ionen in die gebildete Apatit-Phase kommt (Gl. 4.7):



Dies wird gestützt durch eine leichte Verschiebung der Apatit-Gitterkonstanten a ($a_{\text{CPC}} = 9,43\text{--}9,44 \text{ \AA}$; $a_{\text{S100}} = 9,47\text{--}9,49 \text{ \AA}$) und c ($c_{\text{CPC}} = 6,88\text{--}6,89 \text{ \AA}$; $c_{\text{S100}} = 6,90\text{--}6,92 \text{ \AA}$)

in nach einer Abbindezeit von 168 h gemessenen Proben, da eine Erhöhung beider Parameter charakteristisch für die Bildung von (carbonathaltigem) Strontiumapatit bzw. Strontium-substituiertem Hydroxylapatit ist [110]. Jedoch bleibt kritisch anzumerken, dass die Rietveld-Analyse durch die geringe Kristallinität der Proben erschwert wurde und die Gitterparameter daher nur mit begrenzter Genauigkeit bestimmt werden konnten.

4.1.3 pH-Wert Entwicklung

Während der Abbindereaktion von CaP-Zementen kommt es durch Hydrolyse der Precursorkomponenten im Auslagerungsmedium zum Absinken des pH-Wertes [111], wie anhand der in den Gleichungen 4.4 und 4.7 deutlich wird. Tatsächlich wurde bei allen hier untersuchten Zementen während der ersten Tage der Auslagerung in Zellkulturmedium zunächst ein pH-Abfall beobachtet. Dieser erreichte um Tag 5 ein Maximum und war im Fall des CPC besonders ausgeprägt. Anschließend näherte sich der pH-Wert wieder dem Ausgangswert von 7,4 an. Im Fall der Sr-modifizierten Zemente wurde ein vergleichbares Muster beobachtet, allerdings war das Absinken des pH-Wertes, insbesondere im Fall der S-Typ-modifizierten Zemente, weniger ausgeprägt und die Schwankung des pH-Werts demnach geringer (Abb. 4.5).

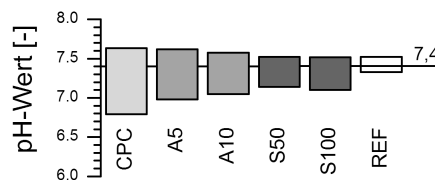


Abb. 4.5: Variation des pH-Werts bei Auslagerung von Sr-modifizierten Zementen und CPC in Zellkulturmedium.

Es ist bekannt, dass Knochenzellen sensitiv auf pH-Änderungen reagieren. So ist die osteoblastäre Mineralisierung bei pH 7,0 nahezu vollständig behindert, während die osteoklastäre Resorption bei pH-Werten unterhalb 7,2 stimuliert wird [112]. Entsprechend ist für die hier entwickelten Zemente eine möglichst geringe Schwankung des pH-Werts während der Zementierungsreaktion wünschenswert, wobei sich sowohl die A- als auch die S-Typ-Modifikation als vorteilhaft erwiesen: gerade im Überstand der

S-Typ-Zemente sank der pH-Wert nicht unter 7,15 ab. Eine mögliche Erklärung liefert die bereits erwähnte Ansäuerung des Auslagerungsmediums durch Hydrolyse der Precursorkomponenten: Vergleicht man die mittels XRD zeitlich aufgelöste Abnahme der CaCO_3 - und SrCO_3 -Konzentrationen in CPC und S100 (Abb. 4.1 und 4.4), so fällt auf, dass SrCO_3 schneller umgesetzt wird als CaCO_3 . Bereits nach 6 h sind nur noch 4,4 % gegenüber 8,9 % der ursprünglichen 9,1 % SrCO_3 bzw. 9,5 % CaCO_3 enthalten. Zugleich beträgt der Anteil der gebildeten Apatit-Phase in S100 bereits 45,4 % gegenüber 33,5 % in CPC. Beides spricht für eine schnellere Umsetzung der Precursorkomponenten im Fall des S-Typ-Zements.

4.1.4 Ionische Interaktionen mit wässrigen Medien

Calciumphosphate insgesamt zeigen auch nach dem initialen Abbinden im Kontakt mit wässrigen Medien eine starke ionische Interaktion mit ihrer Umgebung. Dies kann durch die Bildung von Kristalliten an der Materialoberfläche bzw. deren Wachstum, durch Degradation (physiko-chemische Lösung des Materials) oder durch den Austausch von Ionen im Sinne einer Substitution geschehen [113–115], wobei unterschiedliche CaP-Phasen unterschiedliches Verhalten zeigen. Ziel der hier entwickelten Knochenzemente war die Beeinflussung von Knochenzellen mit Hilfe aus dem Zement freigesetzter Sr^{2+} -Ionen, jedoch spielen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* Calcium- und Phosphatkonzentration ebenfalls eine entscheidende Rolle für zelluläre Reaktionen. Daher wurden die Überstände von Proben von CPC, A- und S-Typ-Zementen während Auslagerung in Zellkulturmedium sowie während der Kultivierung osteogener Zellen auf den Materialien untersucht.

Ca^{2+} - und PO_4^{3-} -Freisetzung und -aufnahme

Es ist bekannt, dass Hydroxylapatit-bildende CaP-Zemente während des Abbindens Ca^{2+} -Ionen aufnehmen [97]. Ursache ist die fortschreitende Apatitbildung an der Zementoberfläche, bei der Ca^{2+} aus der Umgebung gebunden wird. Dies konnte auch im Fall der vorliegenden Zemente beobachtet werden, wobei die höchste Ca^{2+} -Aufnahme für reinen CPC gemessen wurde (Abb. 4.6). Der Ca^{2+} -Gehalt im Überstand von CPC-Proben sank trotz des regelmäßigen Wechsels des Mediums ($[\text{Ca}]_{\alpha\text{MEM}} = 1,8 \text{ mM}$) immer

wieder um ca. 1,3 mM auf rund 0,5 mM ab. Dabei wurde kein Unterschied zwischen OS^+ - und OS^- -Medium festgestellt. Für alle Sr-modifizierten Zemente wurde ebenfalls eine Aufnahme von Ca^{2+} (also ein Absinken der Konzentration im Medium) beobachtet, jedoch in geringerem Maße als für CPC. Interessanterweise war die Tendenz zur Ca^{2+} -Aufnahme bei A-Typ-Zementen am geringsten ausgeprägt. Es ist vorstellbar, dass durch das zusätzlich eingebrachte $SrCO_3$ (ohne gleichzeitige Reduktion von $CaCO_3$ wie bei den S-Typ-Proben) und dessen Lösung im Medium lokal eine ausreichend hohe Konzentration zweiwertiger Kationen (Ca^{2+} und Sr^{2+}) entsteht, die die zusätzliche Ca^{2+} -Aufnahme aus dem Umgebungsmedium vermindert. Eine systematische Abhängigkeit der Calcium-Aufnahme vom Sr-Gehalt der S-Typ-Zemente wurde allerdings nicht festgestellt.

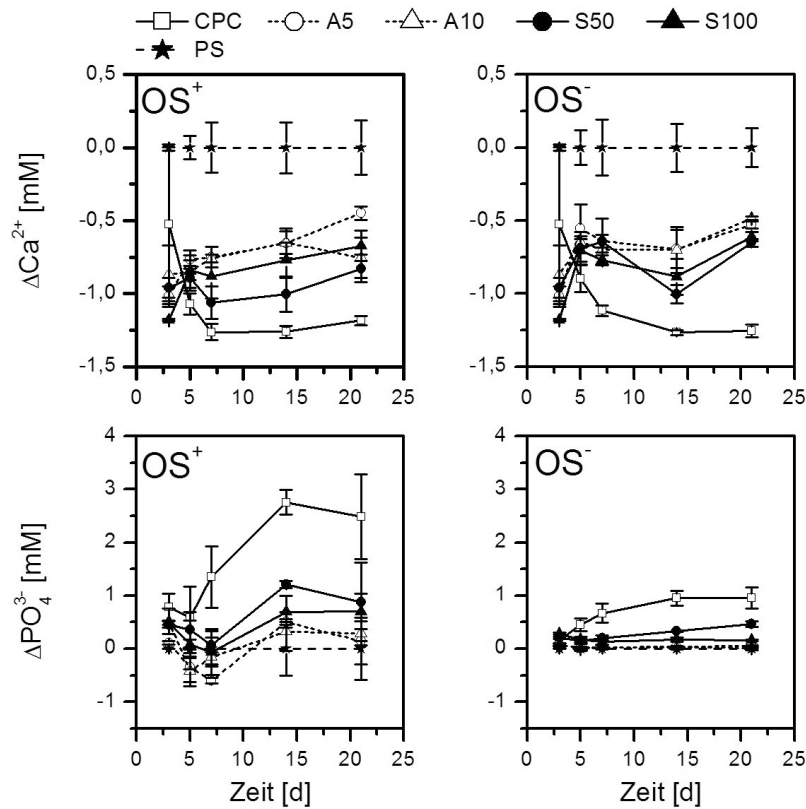


Abb. 4.6: Relative Änderung der Ca^{2+} - und Phosphat-Konzentration in Zellkulturmedium (OS^+ und OS^-) bei Auslagerung von Sr-modifizierten Zementen und CPC. Als Referenz dient PS.

Deutliche Unterschiede zwischen OS^+ - und OS^- -Medium ergaben sich bzgl. der Phosphat-Konzentration¹: zwar wurde generell aus allen Zementen Phosphat freigesetzt, jedoch war die Freisetzung im Medium mit osteogenen Supplementen signifikant erhöht ($p < 0,05$). Beispielsweise wurde im Überstand der CPC-Proben in OS^+ -Medium eine an Tag 14 gegenüber OS^- um den Faktor 3 erhöhte Phosphat-Konzentration gemessen. Dies ist überraschend, da eine Phosphat-Freisetzung generell nur durch Lösung der Precursorkomponenten α -TCP (Gl. 4.1) oder DCPA (Gl. 4.2) sowie eventuell in geringen Mengen vorhandener transienter CaP-Phasen entstehen kann, da sowohl im Precursor enthaltener als auch beim Aushärten des Zements gebildeter HA eine vielfach geringere Löslichkeit aufweist (vgl. Tab. 2.3).

Die beschriebenen Änderungen der Calcium- und Phosphatkonzentrationen im Medium lassen einen Einfluss der Materialien bzw. deren Modifikation auf die zelluläre Reaktion erwarten. So ist beispielsweise bekannt, dass Ca^{2+} -Konzentrationen um 1,8 mM die Proliferation, solche um 0,09 mM dagegen die osteogene Differenzierung osteoblastärer Vorläuferzellen begünstigen. Ebenso kann durch erhöhte Phosphatkonzentrationen die Apoptose osteogener Zellen ausgelöst werden [21]. Jedoch lässt sich, wie von Chai *et al.* formuliert, kein für die Osteogenese optimaler Bereich der Ca^{2+} - und Phosphat-Konzentration festlegen, da sowohl Proliferation als auch Differenzierung der unterschiedlichen beteiligten Zelltypen von jeweils anderen Konzentrationen begünstigt oder inhibiert werden. Gleiches gilt auch für die Osteoklastogenese sowie die osteoklastäre Aktivität [27,116].

Strontium-Freisetzung in verschiedenen Medien

Die Freisetzung von Sr^{2+} -Ionen aus modifizierten Zementen wurde zunächst während der Auslagerung von Zementproben, die zuvor 4 Tage in feuchter Atmosphäre ausgehärtet worden waren, in physiologischer NaCl-Lösung (gepuffert mit TRIS), in Zellkul-

¹ Aufgrund des im OS^+ enthaltenen β -GP ist die mittels ICP gemessene Phosphat-Konzentration um 5 mM erhöht, jedoch ist dieses „zusätzliche“ Phosphat chemisch gebunden und steht somit für die hier betrachteten Reaktionen nicht zur Verfügung. Entsprechend wird in Abbildung 4.6 die Änderung der Phosphat-Konzentration anstatt der absoluten Konzentration dargestellt.

turmedium (OS^+ und OS^-) sowie während der Zellkulturversuche zur Osteogenese (also in Anwesenheit von Zellen) untersucht.

Die Ergebnisse der Auslagerung in NaCl/TRIS-Puffer sind in Abbildung 4.7 A dargestellt. Zunächst wird deutlich, dass die Kinetik der Freisetzung von der Art der Sr-Modifikation abhängt ($p < 0,05$): Während die Sr^{2+} -Konzentration im Überstand der A-Typ-Zemente in NaCl/TRIS-Puffer kontinuierlich zunahm, kam es bei S-Typ-Zementen nach einer anfänglich erhöhten Sr^{2+} -Konzentration im Überstand zur Ausbildung einer weitgehend stabilen Konzentration von $0,32 \pm 0,03$ bzw. $0,75 \pm 0,05$ mM Strontium (S50 bzw. S100). Weiterhin hing die letztlich gemessene Ionenkonzentration von der im Material enthaltenen Sr-Menge ab: bei doppeltem Sr-Gehalt im Zement wurden auch ungefähr die doppelten Konzentrationen im Überstand gemessen.

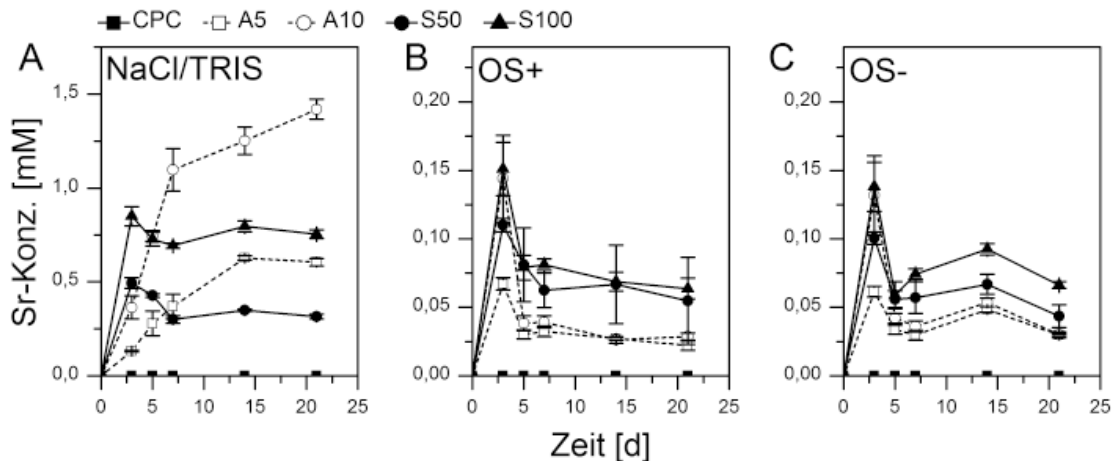


Abb. 4.7: Strontium-Konzentration im Überstand Sr-modifizierter Zementproben während der Auslagerung in NaCl/TRIS-Puffer sowie Zellkulturmedium mit (OS^+) und ohne (OS^-) osteogenen Supplementen.

Wurden die Zementproben dagegen in Zellkulturmedium mit oder ohne Zusatz osteogener Supplemente ausgelagert, wurden deutlich niedrigere Sr^{2+} -Konzentrationen im Überstand gemessen (Abb. 4.7 B und C). Dabei scheint die Zugabe von osteogenen Supplementen (siehe Kap. 3.3.1) zum Medium keinen Einfluss auf die Freisetzung von Sr^{2+} -Ionen zu haben. Anders als in NaCl/TRIS-Puffer kam es hier bei allen untersuchten Materialien zu einer initial höheren Freisetzung mit anschließender Einstellung einer weitgehend konstanten Sr^{2+} -Konzentration im Bereich von $0,03 \pm 0,01$ und $0,04 \pm 0,01$ mM für A5- bzw. A10- und $0,06 \pm 0,01$ und $0,07 \pm 0,01$ mM im

Überstand von S50- bzw. S100-Proben. Entsprechende Konzentrationen konnten also für spätere Zellkulturexperimente angenommen werden. Tatsächlich wurden auch während der *in vitro*-Untersuchungen zur Osteogenese in Zellkulturüberständen mit den zellfrei ausgelagereten Proben vergleichbare Sr^{2+} -Konzentrationen gemessen (siehe Anhang, Abb. A.5). Interessanterweise war kein eindeutiger Einfluss des Gesamt-Strontiumgehalts der jeweiligen Probe auf die Freisetzung zu erkennen, vielmehr setzten S-Typ- generell mehr Sr^{2+} -Ionen als A-Typ-Zemente frei. Ein durch höhere Beimischung bzw. Substitution erhöhter Strontiumgehalt resultiert dagegen nur in einem geringen, nicht signifikanten Anstieg der Sr^{2+} -Konzentration im Zellkulturmedium.

Als Ursache für das unterschiedliche Freisetzungsverhalten in NaCl/TRIS-Puffer und Zellkulturmedium kann einerseits die komplexere Zusammensetzung des Mediums angenommen werden, das neben Na^+ und Cl^- noch zahlreiche weitere Ionen enthält. Außerdem ist davon auszugehen, dass während des fortschreitenden Abbindens der Zemente aus dem Material freigesetzte Ionen an der Wiederausscheidung der Apatit-Phase beteiligt sind, die wiederum aufgrund der hohen Bioaktivität des Materials noch gesteigert wird. Zudem wurde serumhaltiges Medium verwendet, wobei die darin enthaltenen Proteine sowohl eine Beschleunigung der physiko-chemischen Lösung (durch Komplexierung freigesetzter Ionen und damit Verschiebung des Reaktionsgleichgewichts) als auch eine Verlangsamung (z. B. durch Bildung einer dichten Proteinschicht auf der Oberfläche, welche als Diffusionsbarriere wirken kann) bewirken könnten [116]. In Kooperation mit dem Institut für Physikalische Chemie der Justus-Liebig-Universität Gießen (AG Prof. Janek) konnte bestätigt werden, dass Serumproteine die Oberflächen der Zemente belegen und wahrscheinlich dadurch die Auflösung hemmen [117].

4.1.5 Charakterisierung von Oberfläche und Bulkmaterial

Anhand von REM-Aufnahmen der Oberflächen von frisch hergestellten, 4 Tage in feuchter Atmosphäre ausgehärteten und anschließend für 7 Tage in Zellkulturmedium (OS^-) gelagerten Zementproben (Abb. 4.8) wird ersichtlich, dass die Art der Modifikation (A-

oder S-Typ²) Einfluss auf die Morphologie der Zementoberfläche hat: Im Gegensatz zu CPC und A-Typ-modifizierten Zementen zeigten S50- und S100-Proben ein feinkörnigeres Gefüge, was unter anderem auf den zusätzlichen Mahlschritt während der Precursorherstellung zurückzuführen ist.

Die zum Aushärten der Zemente beitragende Apatitkristallbildung während der weiteren Auslagerung in Zellkulturmedium ist ebenfalls zu beobachten (vgl. höher aufgelöste Bilder im Anhang, Abb. A.1): Die nach 4 Tagen in feuchter Atmosphäre bereits miteinander verbundenen, jedoch noch deutlich erkennbaren Körner des CPC-Precursors waren nach 7 Tagen in Zellkulturmedium mit einer dichten Schicht kleiner Kristallite überzogen. Im Fall der A-Typ-Zemente war die Kristallitstruktur zu diesem Zeitpunkt gröber ausgeprägt, während die Einzelpartikel bereits deutlich weiter miteinander verwachsen waren. Schließlich war auf S50- und insbesondere S100-Proben zu erkennen, wie das fortschreitende Zusammenwachsen einzelner Partikel und die Bildung feiner, dicht verteilter Apatitkristallite zu einer Glättung der Probenoberfläche geführt hatten. Dies konnte auch anhand von Rauheitsmessungen (Abb. 4.9 A) bestätigt werden: Gegenüber CPC ($R_a = 0,69 \mu\text{m}$ an Tag 7) wiesen sowohl A5- und A10- ($R_a = 0,48$ bzw. $0,55 \mu\text{m}$) als auch S50- und S100-Proben ($R_a = 0,23$ bzw. $0,36 \mu\text{m}$) deutlich geringere Rauheiten auf.

Weiterhin kam es zu einer Verdichtung der Zementmatrix. Alle Zemente besaßen im frisch hergestellten Zustand eine vergleichbare offene Porosität im Bereich von 40–44 Vol.-%, die binnen 3 Wochen auf 26–33 Vol.-% abnahm (Abb. 4.9 B). Die initiale Porosität ist dabei auf den wässrigen Anteil der Zementpaste zurückzuführen, wobei ein Einfluss des l/p-Verhältnisses auf die offene Porosität des Zements (wie beispielsweise von Ginebra *et al.* beschrieben [105]) im untersuchten l/p-Bereich nicht festgestellt werden konnte.

Anhand von REM-Untersuchungen an Bruchflächen unter feuchter Atmosphäre ausgehärteter Zemente (Abb. 4.10) wird deutlich, dass es bei CPC sowie S-Typ-modifizierten Zementen zur Ausbildung einer weitgehend homogenen Zementmatrix kam, wohin-

²Der Ansatz, Zemente durch entsprechende Mengen von CaCO_3 und DCPA zu modifizieren (B-Typ), wurde aufgrund der geringen mechanischen Festigkeit dieser Materialien (vgl. Kap. 4.1.6) nicht weiter verfolgt.

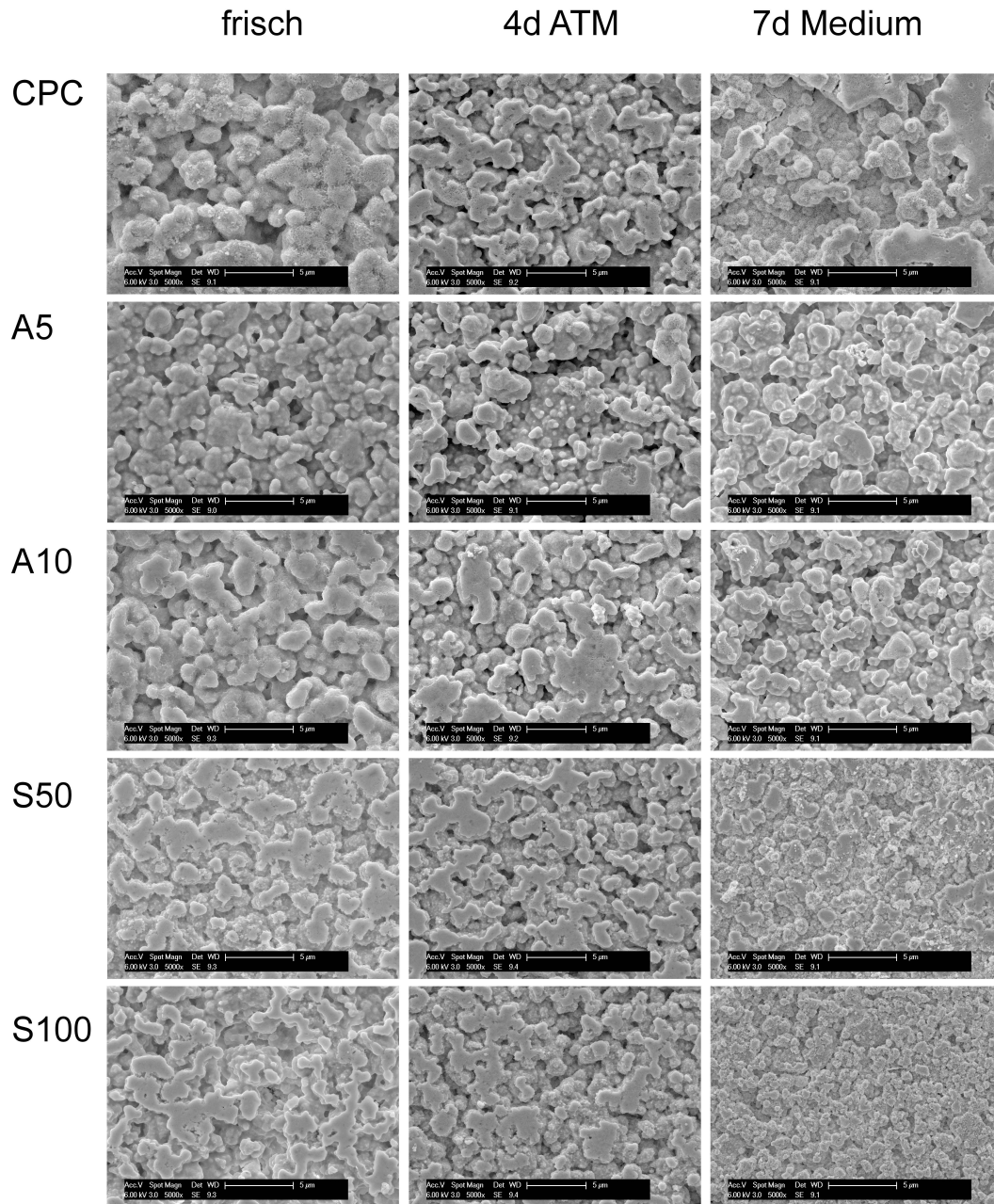


Abb. 4.8: Oberfläche von CPC und A- bzw. S-Typ-modifizierten Zementen nach der Herstellung (frisch) sowie nach 4-tägigem Aushärten (4 d unter feuchter Atmosphäre, ATM) bzw. 7-tägiger Auslagerung in Zellkulturmedium (Maßbalken: 5 µm).

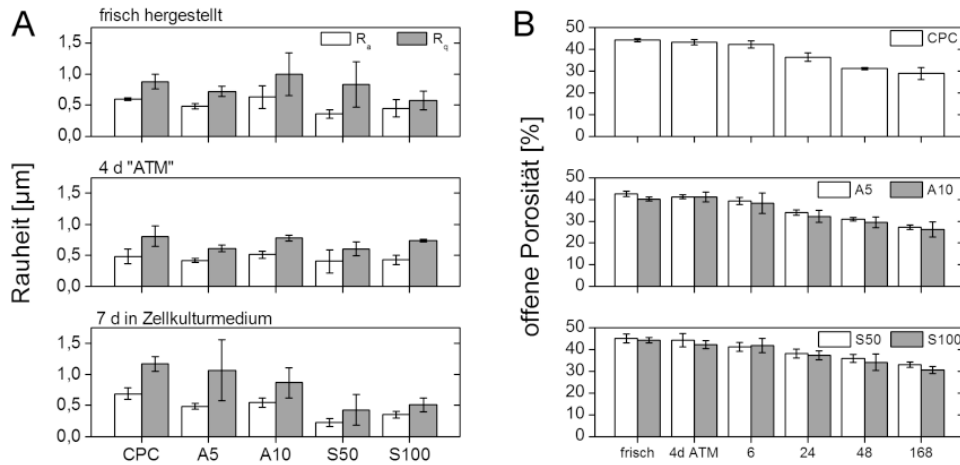


Abb. 4.9: Rauheit frisch hergestellter sowie für 4 Tage unter feuchter Atmosphäre („ATM“) bzw. in Zellkulturmedium ausgelagerter Zemente (A) sowie Entwicklung der offenen Porosität der Materialien während der Auslagerung (B). Detaillierte Daten zur Rauheit finden sich im Anhang in Tabelle A.1.

gegen im Fall der A5- und A10-Proben eine Komposit-artige Struktur, bestehend aus einer Zementmatrix mit darin eingebetteten Partikeln von ca. 5–8 μm Größe, vorlag. Mittels EDX (Energie-dispersive Röntgenspektroskopie) konnten diese Partikel als SrCO_3 -Kristalle identifiziert werden, welche auch nach 7-tätigem Aushärten in feuchter Atmosphäre noch im Zement vorlagen und auch mittels XRD detektiert werden konnten (siehe Anhang, Abb. A.2).

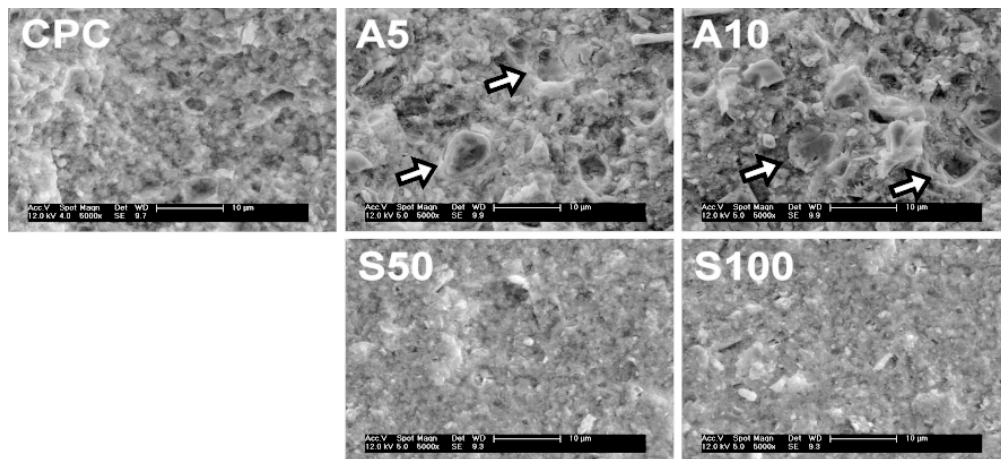


Abb. 4.10: REM-Aufnahmen an Bruchflächen von CPC und Sr-haltigen Zementen. Die Pfeile deuten auf in der Zementmatrix eingelagerte SrCO_3 -Kristallite im Fall der A-Typ Zemente.

Mit Hilfe einer ToF-SIMS-Oberflächen- und Bulkanalyse (Abb. 4.11) konnte gezeigt werden, dass sich SrCO_3 -Partikel sowohl an der Oberfläche als auch innerhalb des Zements nachweisen lassen. Deutlich erkennbar ist die weitgehend homogene Verteilung des Strontium in S-Typ-Proben (hier: S100), während die Cluster-artige Verteilung im Fall der dargestellten A10-Probe die rund $5\ \mu\text{m}$ großen SrCO_3 -Partikel repräsentiert.

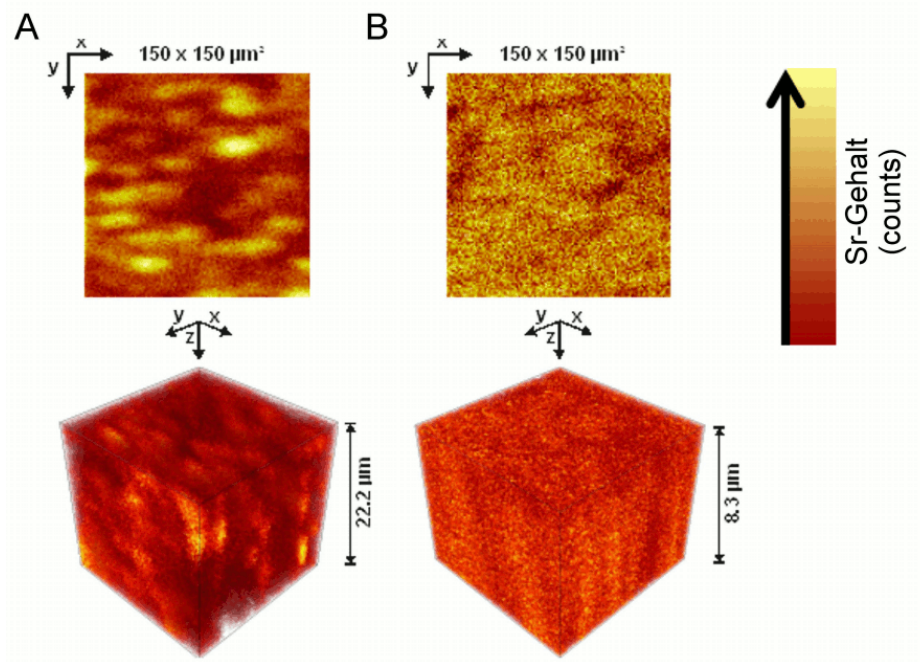


Abb. 4.11: ToF-SIMS Oberflächen- und Volumenanalysen der Sr^{2+} -Verteilung in A10- (A) und S100-Proben (B). Nach: [118] mit freundlicher Genehmigung von Elsevier.

4.1.6 Mechanische Eigenschaften

Anhand quaderförmiger Zementproben wurde zunächst die Druckfestigkeit der entwickelten Zemente nach 4-tägiger Auslagerung in Wasser untersucht. Wie zu erwarten zeigten alle Materialien sprödes Bruchverhalten mit einer Bruchdehnung $\epsilon_{\text{Bruch}} \leq 2\%$ (Abb. 4.12 B). Sowohl A- als auch B-Typ-modifizierte Zemente besaßen eine gegenüber reinem CPC deutlich reduzierte Druckfestigkeit, wobei für höhere SrCO_3 -Gehalte tendenziell höhere Festigkeitswerte gemessen wurden (Abb. 4.12 A). Während CPC an Tag 4 der Auslagerung eine Festigkeit von $\sigma_D = 27,25 \pm 5,84\ \text{MPa}$ besaß, erreichten A5- und A10- bzw. B5- und B10-Proben lediglich $12,41 \pm 2,57$ und $15,63 \pm 1,73\ \text{MPa}$ bzw.

11,41 ± 1,29 und 13,7 ± 2,57 MPa. Dagegen zeigten S-Typ-modifizierte Proben einen deutlichen Anstieg der Festigkeit auf 38,6 ± 4,4 (S50) und 41,8 ± 4,9 MPa (S100), was einer Zunahme gegenüber CPC um ca. 50 % entspricht. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde die Modifikation mit SrCO₃/DCPA (B-Typ) nicht weiter verfolgt und nur A- und S-Typ-Zemente zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Auslagerung untersucht.

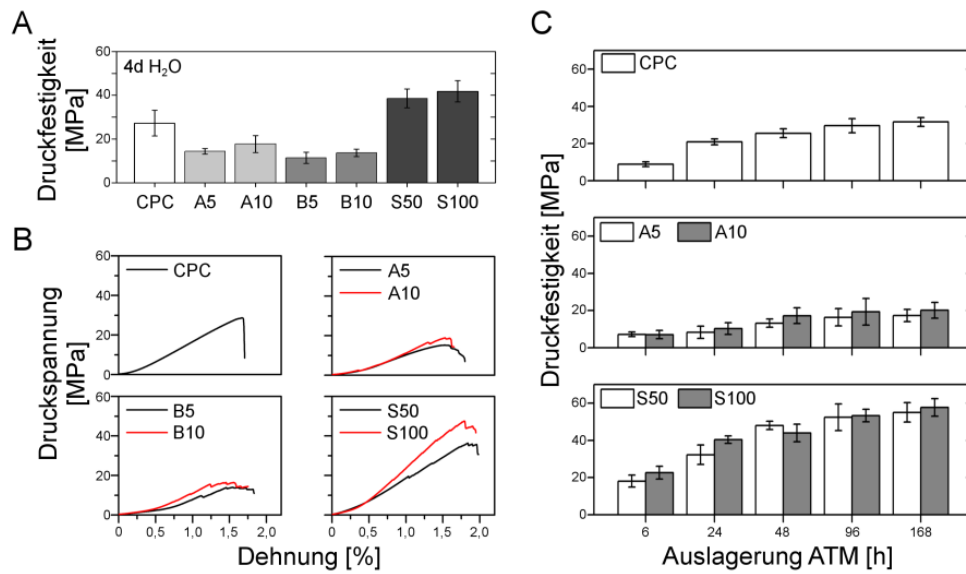


Abb. 4.12: Druckfestigkeit (A) und ausgewählte Spannungs-Dehnungskurven (B) von CPC und modifizierten Zementen nach 4-tägiger Auslagerung in Wasser. Zeitliche Entwicklung der Druckfestigkeit während 7-tägiger Auslagerung in feuchter Atmosphäre (C).

Generell ist für mineralische Knochenzemente eine initial geringere und erst während der Auslagerung bzw. des Aushärtens ansteigende Festigkeit zu erwarten, parallel zu dem unter Kap. 4.1.5 beschriebenen Zusammenwachsen der Partikel des Precursors. Entsprechend wurde die Entwicklung der Druckfestigkeit während einer 7-tägigen Auslagerung der Druckproben in feuchter Atmosphäre untersucht. Für alle Materialien wurde eine Zunahme der Druckfestigkeit mit zunehmender Auslagerungsdauer gemessen, wobei der Anstieg nach Tag 4 nicht mehr signifikant war (Abb. 4.12 C). Wiederum besaßen A-Typ-Proben eine gegenüber CPC geringere Festigkeit, wobei kein signifikanter Einfluss des SrCO₃-Gehalts festgestellt werden konnte. Grund für die verminderte Festigkeit ist das bereits beschriebene Vorliegen in eine Sr-freie Zementmatrix eingebetteter SrCO₃-Kristallite mit geringer Matrixanbindung, welche auch nach 7-tägiger

Tab. 4.2: Übersicht über in der Literatur beschriebene Sr-haltige, (HA + SrCO₃) bzw. SrHA-bildende Zementformulierungen und deren mechanische Eigenschaften.

Zementreaktion	Sr/(Sr+Ca)	Druckfestigkeit [MPa]*	Referenz
Vergleichbar A-Typ:			
SrACP + DCPA → HA + SrCO ₃ + DCPA	0-20 (10)*	74,9	[82]
(ACP + DCPD) + SrCO ₃ → HA + SrCO ₃	0-25 (8)	~40	[81]
Vergleichbar S-Typ:			
Sr-α-TCP → SrHA	1-10 (alle < CPC)	~10	[85]
DCPD + CaO + SrCO ₃ → SrHA	15	~20	[83]
Sonstige:			
TTCP + DCPA + DSPA → HA + TCP + SrTCP	0, 5, 10 (5)	66,6	[79]

* In Klammern ist das Sr/(Sr+Ca) Verhältnis angegeben bei dem die höchste Festigkeit erreicht wurde.

Auslagerung noch nachweisbar waren und im Belastungsfall als rissauslösender Defekt wirkten. Dies wird auch anhand von REM-Aufnahmen der Bruchflächen deutlich, die aus der Matrix gelöste, in sich intakte Kristallite innerhalb der Bruchebene zeigen (vgl. Abb. 4.10).

Erneut zeigten alle untersuchten Proben sprödes Bruchverhalten. Dabei waren die erreichten Druckfestigkeiten gegenüber in Wasser ausgelagerten Proben leicht erhöht, was vermutlich auf die während der Auslagerung erhöhte Temperatur von 37 °C (gegenüber Raumtemperatur) zurückzuführen ist. So wurden nach 4 Tagen für CPC bis zu 29,6 ± 3,8 MPa und für S50 und S100 52,4 ± 7,1 MPa bzw. 53,3 ± 3,4 MPa gemessen. A5- bzw. A10-Zemente erreichten nach 7 Tagen „finale“ Druckfestigkeiten von 17,3 ± 3,2 und 20,2 ± 4,2 MPa und damit deutlich weniger als reiner CPC mit 31,6 ± 2,4 MPa. Die höchste Festigkeit nach 7 Tagen wurde mit 57,7 ± 4,7 MPa für Proben vom Typ S100 gemessen, was eine Steigerung um mehr als 80% gegenüber CPC und somit eine deutliche Verbesserung bedeutet.

Beispiele für dem A-Typ vergleichbare, also zu einer HA-Matrix mit darin enthaltenem SrCO₃ abbundene Zemente, finden sich auch in der Literatur (siehe Tab. 4.2): Yu *et al.* beschreiben Zemente, welche laut XRD-Analyse im abgebundenen Zustand ebenfalls vorwiegend aus den Phasen HA, SrCO₃ und DCPA zusammengesetzt sind, jedoch aus einem Precursorgemisch von SrACP und DCPD hergestellt wurden. Im frisch ab-

gebundenen Zement liegen dort ca. 5 μm große DCPD-Kristalle vor, was strukturell an A-Typ-Zemente erinnert. Bei vergleichbaren $\text{Sr}/(\text{Sr}+\text{Ca})$ -Verhältnissen werden nach 2 Tagen ca. 20 MPa, nach 10 Tagen Auslagerung in Wasser sogar 64 MPa Druckfestigkeit und damit gegenüber der Sr-freien Referenz deutlich gesteigerte Festigkeiten erreicht. Somit ergibt sich anfänglich ein mit den A-Typ-Zementen vergleichbares Festigkeitsniveau, allerdings kommt es dann durch Reaktion des DCPA zur weiteren Apatitbildung und damit zur weiteren Verfestigung der Matrix [82]. Auch in der Matrix der von Wang *et al.* beschriebenen Zemente auf ACP-Basis liegt SrCO_3 vor, allerdings wurde hier der Precursor mit SrCO_3 intensiv vermahlen, so dass keine größeren Kristallite mehr im Bulkmaterial enthalten sind. Bei einem Anteil von 10 Gew.-% SrCO_3 , also einer dem A10-Zement vergleichbaren Endzusammensetzung, wurden bis zu 40 MPa Druckfestigkeit erreicht [81].

Interessanterweise werden in der Literatur bislang keine SrHA-bildenden Zementvarianten beschrieben, bei denen die Sr-Modifikation zu einer Steigerung der mechanischen Kennwerte gegenüber Strontium-freien Vergleichszementen führte. Insbesondere bei dem von Saint-Jean *et al.* hergestellten, auf zuvor synthetisiertem Strontiumsubstituiertem α -TCP basierenden Zement, der durch Hydrolyse direkt zu SrHA abbindet, führte die Sr-Substitution, unabhängig vom Sr-Gehalt, zu einer signifikanten Abnahme der Druckfestigkeit [85]. Dagegen scheint sich die Substitution von Ca^{2+} - durch Sr^{2+} -Ionen positiv auf die Härte apatitischer Materialien auszuwirken: dies wurde anhand gesinterter HA-Keramiken mit bis zu 10 %-iger Sr-Substitution und sogar an in Sr-haltiger Lösung ausgelagerten Wirbelkörpern, in denen es zur diffusionsgesteuerten Substitution kam, gezeigt [119,120].

Mit Hilfe des sog. *ball on 3 balls*-Tests (siehe Kap. 3.2.6) wurde die biaxiale Zugfestigkeit σ_Z von für 4 Tage gehärteten sowie an danach für weitere 7 Tage in Zellkulturmedium (OS^-) ausgelagerten Zementen bestimmt. Für alle Materialien ergab sich ein leichter Anstieg der Festigkeit während der Auslagerung in Medium (Abb. 4.13), was mit dem fortschreitenden Abbinden der Zemente zu (Sr-) HA und der damit verbundenen Ausbildung sich verzahnender Kristallite zu erklären ist. Gegenüber CPC ($\sigma_Z = 17,2 \pm 2,9$ bzw. $22,0 \pm 2,9$ MPa nach 4 d in feuchter Atmosphäre bzw. 7 d in Medium) erreichten

A5- und A10-Zemente eine leicht verringerte, S50- und S100-Zemente eine leicht erhöhte Zugfestigkeit. Die Unterschiede waren jedoch nicht statistisch signifikant.

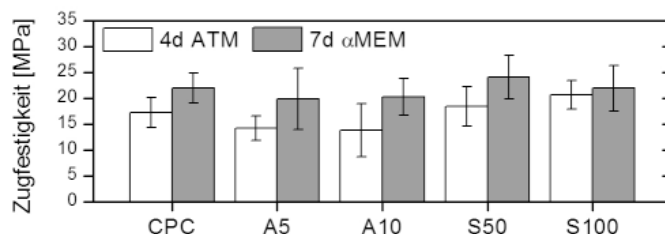


Abb. 4.13: Biaxiale Zugfestigkeit von CPC und Sr-modifizierter Zemente nach 4-tägiger Aushärtung in feuchter Atmosphäre (ATM) und anschließender 7-tägiger Auslagerung in Zellkulturmedium (OS^-), ermittelt mit dem *ball on 3 balls*-Test.

Generell ist für CaP-Zemente, wie für alle spröden Materialien, eine geringe Zugfestigkeit zu erwarten. In Verbundwerkstoffen mit eher sphärischem Füllstoff³, wie dem hier untersuchten A-Typ-Zement, wird die (Biege- bzw. Zug-) Last vorwiegend von der Matrix getragen. Beigemischte Partikel wie hier $SrCO_3$ können in diesem Fall als Rissinitiatoren wirken und die Festigkeit sinkt folglich mit wachsendem belasteten Volumen (also größerer Anzahl möglicher Rissinitiatoren). Der hier verwendete Prüfaufbau zielt jedoch auf eine weitgehende Homogenisierung der Lasteinleitung in die Probe, womit die Empfindlichkeit gegen potentiell rissauslösende Fehlerstellen (hier $SrCO_3$ -Kristallite) sinkt [98]. Dies erklärt, weshalb die A-Typ-Zemente eine dem CPC vergleichbare Festigkeit erreichten. Eine signifikante Steigerung der Zugfestigkeit durch die homogene Strontium-Substitution der S-Typ-Zemente konnte allerdings nicht erreicht werden. Ähnliches beschreiben Curran *et al.* anhand gesinterter, Sr-substituierter Hydroxylapatitkeramiken: zwar führt die Substitution von bis zu 10 % der Ca^{2+} - durch Sr^{2+} -Ionen zu einer erhöhten Härte der gesinterten Materialien, nicht jedoch zu einer signifikanten Steigerung der biaxialen Zugfestigkeit [119].

4.1.7 Röntgendiffraktion

Häufig wird in der klinischen Praxis der post-operative Status eines behandelten Knochendefekts röntgenografisch ermittelt und ggf. über einen längeren Zeitraum verfolgt.

³ Im Vergleich zu Faser-Verbundwerkstoffen oder Füllstoffen mit Whisker-artiger Morphologie

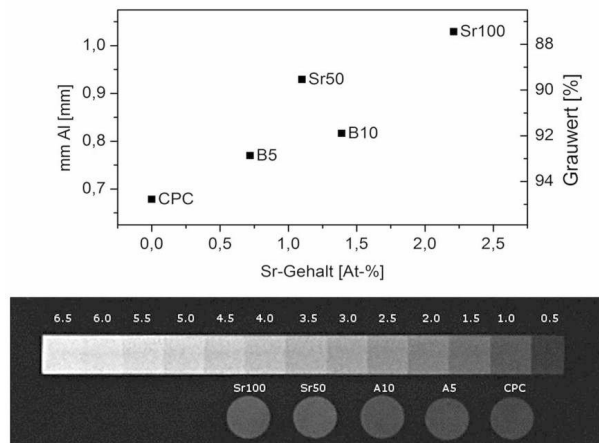


Abb. 4.14: Röntgendichte von CPC und Sr-modifizierten Zementen, ausgewertet mit Hilfe eines Aluminium-Standards mit 0,5 mm Stufenhöhe.

Aufgrund der chemischen Ähnlichkeit der Calciumphosphatzemente zum anorganischen Teil des Knochens besitzen diese jedoch keinen vom umgebenden Knochen (ausreichend) unterschiedlichen Röntgenkontrast. Entsprechend sind sie im Röntgenbild nicht eindeutig identifizierbar und die postoperative Darstellung mittels Röntgen ist nur stark eingeschränkt möglich. Strontium, wie auch ZrO_2 oder BaSO_4 , unterscheiden sich in ihrer Röntgenopazität ausreichend von Calciumphosphaten und wurden bereits als Zusatz zur Steigerung des Röntgenkontrasts in CaP- oder polymerbasierten Knochenfüllstoffen eingesetzt [81, 121]. Für die vorliegenden Zemente wurde ebenfalls eine signifikante Steigerung des Röntgenkontrasts mit zunehmendem Strontium-Gehalt gemessen, wobei S-Typ-Zemente bei vergleichbarem Sr-Gehalt tendenziell höhere Werte erreichten als A-Typ-Proben (Abb. 4.14). Dies ist wahrscheinlich auf die homogene Verteilung des Strontiums zurückzuführen, da durch die relativ geringe laterale Auflösung der Röntgenaufnahme die diskret im A-Typ-Zement verteilten SrCO_3 -Kristalle nicht korrekt abgebildet, sondern mit umliegenden Pixeln geringerer Helligkeit interpoliert werden.

4.2 Zellbiologische Untersuchungen zur Osteogenese

Die Interaktion der Sr-modifizierten Zemente mit Zellen wurde einerseits hinsichtlich der Osteogenese, also der Knochenneubildung durch Osteoblasten, andererseits in Bezug auf die Osteoklastogenese bzw. den zellulären Abbau der Materialien (Resorption) untersucht (Kap. 4.3). Zunächst wurde die zelluläre Reaktion auf Sr^{2+} -Konzentrationen im Bereich der aus dem Material freigesetzten Konzentrationen und darüber analysiert. In weiteren Schritten wurden dann Versuche in indirektem (nur zur Osteogenese) und direktem Materialkontakt (Osteogenese und Osteoklastogenese) durchgeführt.

Aufgrund der bekannten Variabilität zwischen primären Zellen unterschiedlicher Spender wurden in dieser Arbeit humane mesenchymale Stammzellen (hMSC) dreier verschiedener Spender verwendet. Diese unterschieden sich einerseits hinsichtlich ihrer Proliferationsraten, andererseits in der Aktivität der Alkalischen Phosphatase (ALP), des hier verwendeten Markerenzym der osteogenen Differenzierung, unter osteogener Stimulation. Abbildung 4.15 zeigt diese Unterschiede: binnen 21 Tagen vervielfachte sich die Zellzahl bei Spender 40 (rot) beinahe um den Faktor 20, während die Zellzahl bei Spender 315 (blau) um das 13- und bei Spender 41 (schwarz) lediglich um das 9-fache zunahm. Weiterhin nahm die spezifische Aktivität der ALP bei entsprechender Stimulation (OS^+) um das ca. 10- (Spender 40 und 41) bis 30-fache zu (Spender 315).

Die Ursachen solch starker Unterschiede sind vielfältig: neben Alter, Geschlecht und ggf. vorhandenen Erkrankungen des Spenders können auch regelmäßig eingenommene Medikamente und nicht zuletzt genetische Faktoren die Eigenschaften primärer Zellen *in vitro* beeinflussen. Aus diesem Grund werden häufig *Zelllinien*, also meist durch Transfektion immortalisierte oder aus Tumorgewebe stammende Zellen wie beispielsweise SaOS-2 (humane Osteosarkomazelllinie) oder MC3T3-E1 (*murine* Osteoblastenzelllinie) verwendet. Diese bieten stabilere Proliferationsraten und Enzymaktivitäten, zeigen jedoch häufig ein gegenüber primären Zellen abweichendes Verhalten und eine geringere Sensitivität gegenüber veränderten *in vitro*-Bedingungen (beispielsweise zu testenden Biomaterialien) [58]. Daher wurden in dieser Arbeit primäre Spenderzellen verwendet.

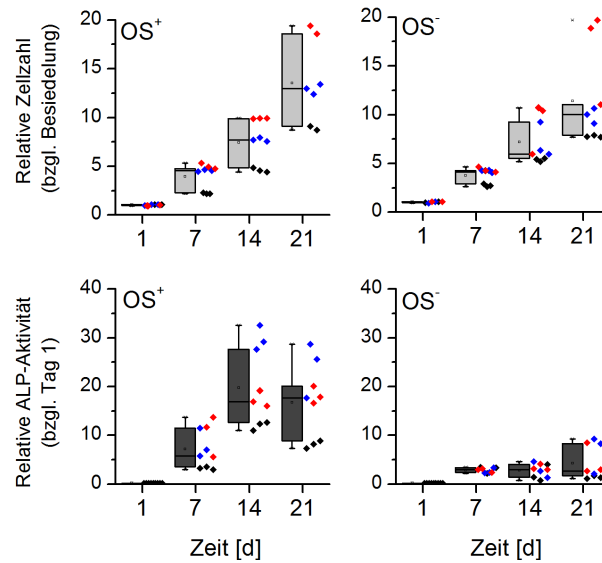


Abb. 4.15: Vergleich der Proliferation und Steigerung der ALP-Aktivität dreier unterschiedlicher Spender während 21-tägiger Kultivierung mit (OS⁺) und ohne (OS⁻) Zugabe osteogener Supplemente. Interne Spender-Bezeichnung 40 (rot), 41 (schwarz) und 315 (blau).

Im Folgenden werden jeweils repräsentative Ergebnisse aus Experimenten mit einem der Spender (Spender 40) gezeigt, die Ergebnisse der mit Zellen der anderen Spender durchgeführten Experimente finden sich im Anhang A.2.

4.2.1 Wirkung von Sr²⁺-Ionen aus SrCl₂ auf hMSC/Osteoblasten

Durch Zugabe von SrCl₂ zum Zellkulturmedium wurden Sr²⁺-Konzentrationen von bis zu 10 mM eingestellt und deren Einfluss auf die Proliferation und osteogene Differenzierung von hMSC innerhalb einer Kultivierungsperiode von 3 Wochen untersucht. Die höchste eingestellte Konzentration war somit weitaus größer als die maximale, in Zellkulturmedium aus Sr-modifizierten Zementen freigesetzte Sr-Konzentration (ca. 0,15 mM, vgl. Kap. 4.1.4).

Bei Konzentrationen von bis zu 0,1 mM konnte für osteogen stimulierte wie auch für unstimulierte Zellen eine mit zunehmender Sr-Konzentration gesteigerte Zellzahl beobachtet werden ($p < 0,05$; Abb. 4.16, linke Spalte). Dies spricht für eine durch die Anwesenheit von Sr²⁺-Ionen gesteigerte Proliferation sowohl unstimulierter hMSC als auch der unter osteogener Stimulation zu Osteoblasten differenzierenden Zellen. Dage-

gen ging die Zahl der OS^+ -Zellen bei $[Sr^{2+}] \geq 0,1$ mM, die der OS^- -Zellen bei ≥ 5 mM deutlich zurück, besonders gut zu erkennen an Tag 21.

Bei jeweils noch höheren Konzentrationen kam es zur weiteren Abnahme der Zellzahl, im Fall von 10 mM zu einem kompletten Absterben der Zellen. Dies lässt sich durch das Erreichen zytotoxischer Konzentrationen erklären, was auch anhand einer oberhalb von 5 mM veränderten Zellmorphologie nachvollzogen werden konnte (nicht gezeigt) und mit in der Literatur beschriebenen Daten übereinstimmt [122].

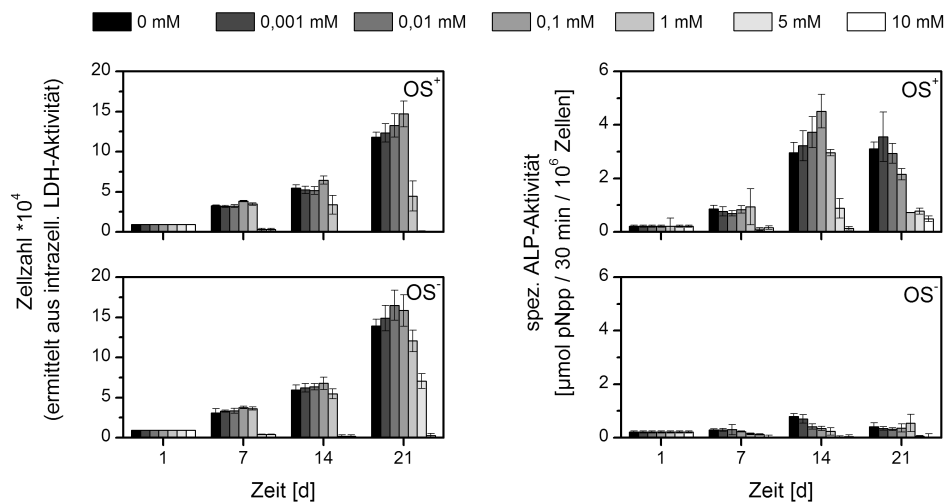


Abb. 4.16: Proliferation (links) und osteogene Differenzierung (rechts) von hMSC unter dem Einfluss unterschiedlicher Sr-Konzentrationen im Medium.

Die Aktivität der ALP, Indikator der fortschreitenden osteogenen Differenzierung, wurde ebenfalls durch die Zugabe von $SrCl_2$ in das Zellkulturmedium signifikant beeinflusst: am 7. Tag der Kultivierung in OS^+ -Kulturen noch gegenüber OS^- recht einheitlich erhöht (bei < 5 mM), nahm die spezifische Enzymaktivität zu späteren Zeitpunkten deutlich mit steigender $SrCl_2$ -Konzentration zu ($p < 0,05$). Ein Maximum wurde an Tag 14 bei $[Sr^{2+}] = 0,1$ mM erreicht, bei höheren Konzentrationen nahm die Aktivität dagegen wieder drastisch ab. An Tag 21 ging die ALP-Aktivität unter Einfluss von 0,001–0,1 mM Sr^{2+} gegenüber Tag 14 wieder zurück und war bei ≥ 1 mM stark verringert. Aufgrund des komplexen Verlaufs der ALP-Aktivität während der osteogenen Differenzierung, charakterisiert durch 2 Maxima während der frühen und späten Differenzierung [14,17], sprechen diese Ergebnisse für eine beschleunigte Differenzierung unter Einfluss von bis zu 0,1 mM Strontium. Die beobachtete Abhängigkeit der Proliferation

und osteogenen Differenzierung von der SrCl_2 -Konzentration deckt sich mit aus der Literatur bekannten Daten: anhand primärer humaner Knochenzellen wurde von Braux *et al.* eine erhöhte Proliferation im Konzentrationsbereich von 0,01–0,1 mM SrCl_2 beobachtet, wohingegen bei ≥ 1 mM eine Inhibierung des Zellwachstums eintrat. Ebenso führten in derselben Studie 0,05 mM SrCl_2 zu einer Stimulation der Expression mit der Osteogenese assoziierter Gene (Kollagen I, MMP-1 und MMP-2) [122].

Dagegen wurde in Studien mit humanen mesenchymalen Stammzellen aus dem Nabelschnurblut (*human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells*, hUMSC) eine Stimulierung der ALP-Aktivität bei bis zu 2 mM SrCl_2 beobachtet [50]. Eine vergleichbare Stimulation der ALP fand sich in *murinen* Osteoblastenkulturen (MC3T3-E1) bei 1 mM Sr^{2+} [123] – Konzentrationen, bei denen in den eigenen Untersuchungen bereits eine Hemmung einsetzte. Interessanterweise schienen auch in den vorliegenden Untersuchungen unstimulierte hMSC toleranter gegenüber erhöhten Sr^{2+} -Konzentrationen zu sein als osteogen stimulierte Zellen, erkennbar an dem unterschiedlich starken Rückgang der Zellzahl an Tag 21 bei einer Konzentration von 1 mM. Während in OS^+ -Proben bereits eine Reduktion der Zellzahl auf rund 30 % gegenüber den bei 0,1 mM SrCl_2 kultivierten Zellen zu verzeichnen war, sank die Zellzahl in OS^- -Proben bei gleicher Sr^{2+} -Konzentration auf lediglich ~80 %. Eine wahrscheinliche Ursache für diese scheinbar widersprüchlichen Ergebnisse liegt in der zwischen Stammzellen und bereits in osteogener Richtung differenzierten Zellen unterschiedlichen Sensitivität gegenüber Sr^{2+} -Ionen. Beim Vergleich von (*murinen*) MC3T3-E1 Osteoblasten und pluripotenten C3H10T1/2-Zellen (ebenfalls *murin*) wurde eine ähnliche Diskrepanz bereits beschrieben, wobei hier neben dem in beiden Zelltypen potentiell unterschiedlich stark exprimierten *calcium sensing receptor* (CaSR) ein weiterer, autokriner Signalweg als Ursache vermutet wird [124]. Somit erklärt sich der beschriebene Unterschied bezüglich der toxisch bzw. inhibierend wirkenden Sr-Konzentrationen durch die unterschiedlichen Zelltypen bzw. -spezies.

4.2.2 Indirekter Einfluss von SrCPC auf hMSC/Osteoblasten

Während der indirekten Untersuchung der SrCPC *in vitro* wurden auf Polystyrol wachsende Zellen mit auf Zementen konditioniertem Zellkulturmedium kultiviert. Entsprechend konnte der Einfluss der aus den Zementen freigesetzten Sr^{2+} -Ionen, aber auch an-

derer, durch den Zement hervorgerufener Änderungen der Medienzusammensetzung wie z. B. die Ca^{2+} -Konzentration, auf die Zellen analysiert werden.

Für alle mit auf Sr-haltigen Zementen vorkonditionierten Medien behandelte Zellen wurde eine gegenüber CPC-Medium signifikant gesteigerte Proliferation beobachtet ($p < 0,05$), sowohl in osteogen stimulierten als auch in unstimulierten Proben (Abb. 4.17, links).

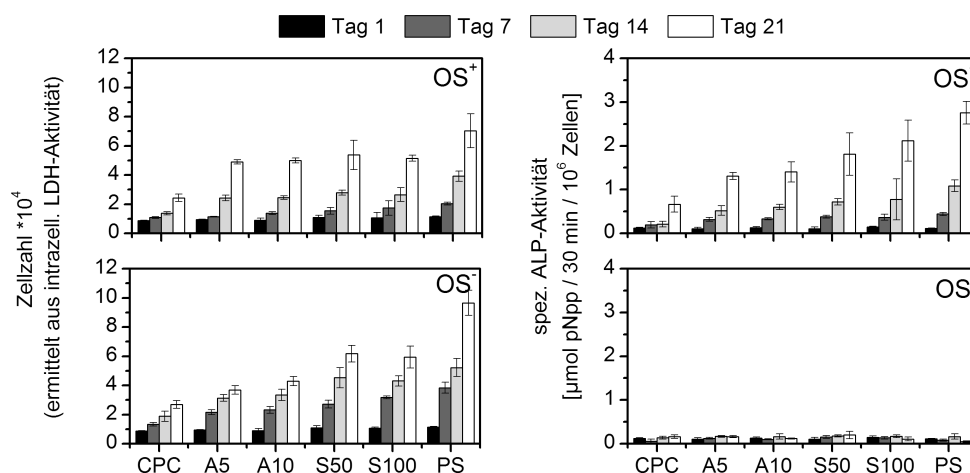


Abb. 4.17: Proliferation (links) und osteogene Differenzierung (rechts) von hMSC unter dem Einfluss auf CPC und verschiedenen SrCPC konditionierter Medien.

Interessanterweise zeigten sich auch hier Unterschiede zwischen OS^+ - und OS^- -kultivierten hMSC: während in nicht stimulierten Kulturen die Zellzahl auf A-Typ-konditionierten Medien zwar gegenüber CPC gesteigert war, erreichte sie lediglich rund 70 % der Zellzahl auf S-Typ-beeinflussten Proben. Im Gegensatz dazu scheint die Art der Sr-Modifikation der Zemente entweder keinen Einfluss auf die Interaktion zwischen Zement und OS^+ -Medium zu haben, oder OS^+ -Zellen anders auf die vorkonditionierten Medien zu reagieren: in OS^+ -Proben war kein signifikanter Unterschied in der Proliferation zwischen A- und S-Typ-konditionierten Medien zu erkennen ($p > 0,05$). Vielmehr erreichten osteogen stimulierte Zellen unter Einfluss der Sr-Zemente eine mit der Kontrollgruppe (frisches Zellkulturmedium, PS) nahezu vergleichbare Proliferation. Anhand der in Abbildung 4.7 gezeigten Ca^{2+} - und Sr^{2+} -Freisetzungsmessungen in OS^+ - und OS^- -Medium kann erstere Ursache ausgeschlossen werden, da keine (nennenswerten bzw. systematischen) Unterschiede in der Ionenfreisetzung festgestellt wurden.

Gleiches gilt für die Entwicklung des pH-Werts, die allerdings aufgrund der Pufferung des Zellkulturmediums im indirekten Kultursystem eine untergeordnete Rolle spielen sollte.

Die ALP-Aktivität (Abb. 4.17, rechts) war bei allen mit OS^+ -Medium von Strontiumhaltigen Zementen behandelten Zellen stärker ausgeprägt als bei solchen mit CPC-konditioniertem Medium, wobei die unter Einfluss der S-Typ-modifizierten Medien kultivierten Zellen die höheren ALP-Aktivitäten zeigten. Die höchsten ALP-Aktivitäten wurden für mit unbehandeltem OS^+ -Medium (PS) kultivierte Zellen gemessen. Dies spricht dafür, dass neben aus den Zementen freigesetzte Sr^{2+} -Ionen auch andere, durch den Zement bedingte Änderungen im Medium einen Einfluss auf die osteogene Differenzierung der hMSC haben, wurden doch durch einfache Zugabe von Sr^{2+} -Ionen zum Medium höhere ALP-Aktivitäten als im reinen Medium erreicht (Kap. 4.2.1). Insbesondere die im Überstand von CPC stark verminderte Ca^{2+} -Konzentration könnte ursächlich für die reduzierte osteogene Differenzierung der damit behandelten Zellen sein, da Ca^{2+} -Ionen, wie eingangs beschrieben, ein wichtiger Regulator der Osteogenese sind [20].

4.2.3 Einfluss von SrCPC auf hMSC/Osteoblasten

Im letzten Schritt der Untersuchungen zur *in vitro*-Osteogenese wurden hMSC direkt auf CPC und Sr-modifizierten Zementen kultiviert. Neben dem indirekten Einfluss der freigesetzten bzw. aus dem Medium aufgenommenen Sr^{2+} - und Ca^{2+} -Ionen und der Änderung des pH-Wertes kommen somit die Oberflächentopographie sowie weitere Materialeigenschaften, etwa spezifische Oberflächenladungen, zum Tragen.

Zunächst wurde die Besiedlungseffizienz, d. h. der Prozentsatz der bei der Besiedlung auf dem Material adhärierten Zellen, bestimmt. Dabei zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen den Materialien (Abb. 4.18): während auf CPC nach 24 h lediglich 24 % und auf A-Typ-modifizierten Zementen ca. 31–36 % der eingesetzten Zellen adhäriert waren, wurde auf S50- und S100-Proben eine weitaus höhere Besiedlungseffizienz von 54 und 60 % ($p < 0,05$) und damit nahezu das Niveau von PS (68 %) erreicht. Eine generell geringe Adhäsion humaner MSC auf CPC wurde bereits in früheren Studien mit dem hier verwendeten CPC beschrieben [96]. Als mögliche Ursache für die verbesserte

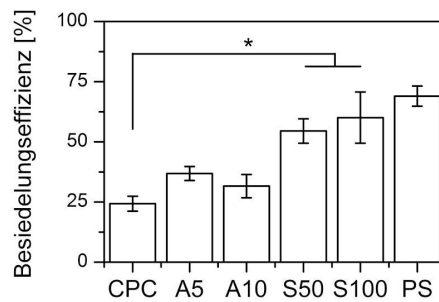


Abb. 4.18: Besiedelungseffizienz: Anteil nach 24 h auf CPC und Sr-haltigen Zementen adhärierten hMSC an der eingesetzten Zellzahl.

Zelladhäsion erscheint die im Fall der Sr-modifizierten Zemente geringere Absenkung des pH-Werts in den sauren Bereich. Einen anderen Erklärungsansatz liefern Xue *et al.*, die anhand von Zellen einer humanen Osteoblasten-Precursor Zelllinie eine verbesserte Adhäsion auf Sr-haltigem Apatit gegenüber reinem HA beschreiben: Diese wird auf eine höhere Löslichkeit und damit erhöhte Bioaktivität (hier im Sinn einer begünstigten Apatit-Bildung an der Oberfläche) des SrHA zurückgeführt, da die feine Apatitkristall-Schicht auf der Materialoberfläche die Zelladhäsion begünstigte [125]. In der Tat zeigen gerade S-Typ-modifizierte Zemente nach Auslagerung in Zellkulturmedium eine durch die Bildung feiner Apatitkristalle homogenere Oberfläche (siehe Anhang, Abb. A.1) und verminderte Rauheit (Abb. 4.9), die unter Umständen zu einer verbesserten Zelladhäsion beitragen. Diese zeigte sich auch bei morphologischer Betrachtung der Zellen mittels Fluoreszenzmikroskopie: Wie in Abbildung 4.19 zu erkennen ist, waren nach 7-tägiger osteogener Stimulation auf CPC nur wenige, eher rund geformte, wenig ausgebreitete Zellen und Zellaggregate auf der Zement-Oberfläche zu sehen. Weiter ausgespreitete, eher spindelförmige Zellen mit deutlich ausgebildetem Cytoskelett wurden dagegen auf A-Typ-Zementen (hier exemplarisch A10), insbesondere jedoch auf S-Typ-Zementen gefunden. Auf letzteren hatte sich nach 7 Tagen bereits ein dichter, konfluenter Zellrasen ausgebildet.

Anhand von REM-Aufnahmen (Abb. 4.20) ist zu erkennen, dass auch nach 14 Tagen noch sehr deutliche Unterschiede zwischen auf CPC und den Sr-modifizierten Zementen kultivierten Zellen bestehen: während auf CPC ausgebreitete, abgeflachte Osteo-

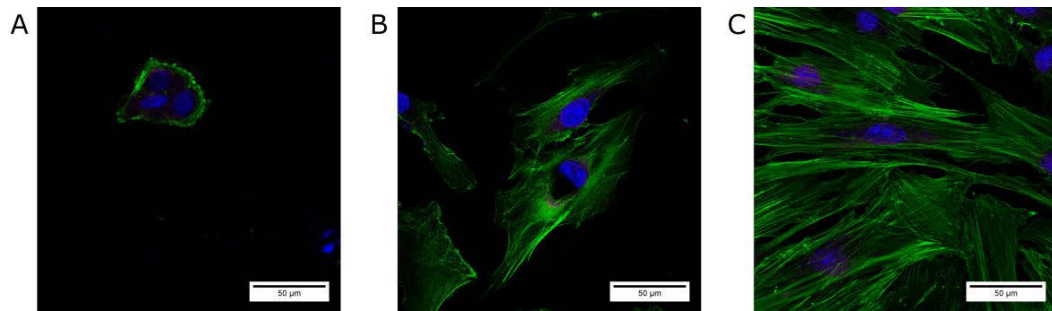


Abb. 4.19: Osteogen stimulierte hMSC auf CPC (A), A10 (B) und S100 (C) an Tag 7. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen (blau: DAPI-Färbung der Zellkerne; grün: Aktin-Färbung des Cytosketts).

blasten in mehrzelligen Clustern auf der Oberfläche zu sehen sind, hat sich auf A- und S-Typ-Zementen ein homogener, konfluenter Zellrasen gebildet.

Die qualitativen Ergebnisse der Fluoreszenz- und Rasterelektronenmikroskopie bestätigen sich in den biochemischen Analysen; auch hier konnten deutliche Unterschiede zwischen CPC und den Sr-modifizierten Zementen festgestellt werden. In Abbildung 4.21 sind exemplarisch die Ergebnisse der Zellzahl- und ALP-Aktivitätsmessung eines der drei untersuchten Spender gezeigt (Spender 40). Auf allen Sr-haltigen Zementen wurde nach 21 Tagen eine gegenüber CPC um das 6- bis 12-fach höhere Zelldichte gemessen (Abb. 4.21, links), wobei dies sowohl unter OS^- - als auch OS^+ -Bedingungen der Fall war. Auf S100 wurde in beiden Fällen sogar eine mit PS vergleichbare Zelldichte erreicht, entsprechend einer Zunahme der Zellzahl um den Faktor 20 über 21 Tage.

Interessanterweise lässt sich im hier gezeigten Experiment ein Unterschied zwischen OS^+ - und OS^- -Kulturen erkennen: Anders als während der zuvor beschriebenen indirekten Versuche zeigten osteogen stimulierte Zellen im direkten Materialkontakt nur auf S-Typ-Proben eine höhere Proliferation, während unstimulierte hMSC unabhängig vom Typ der Modifikation prinzipiell eine in Anwesenheit von Strontium gesteigerte Proliferation aufwiesen. Zwar ist auch hier eine vom jeweiligen Typ bzw. Differenzierungsstadium der Zellen abhängige Reaktion denkbar, allerdings war dieser Effekt nur in einem der drei durchgeführten Experimente erkennbar: Zellen der beiden anderen Spender zeigten sowohl unter OS^+ - wie auch OS^- -Bedingungen eine höhere Zelldichte auf S-Typ-Zementen. Da wie zuvor diskutiert weder Sr^{2+} - noch Ca^{2+} -Konzentrationen im Überstand der Zemente entsprechende systematische Unterschiede aufwiesen, er-

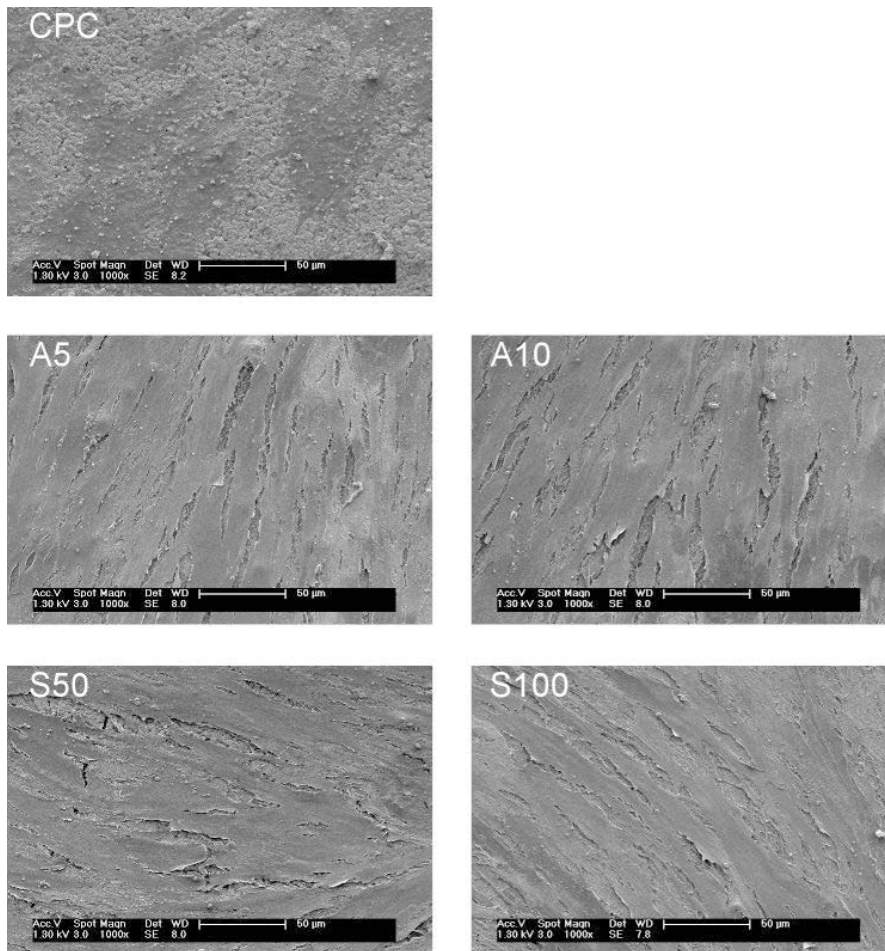


Abb. 4.20: REM-Aufnahmen osteogen stimulierter hMSC auf CPC und Sr-modifizierten Zementen an Tag 14.

scheint hier der Einfluss der homogenen, weniger grob strukturierten Materialoberfläche als wahrscheinlichere Ursache.

Deutlich wird ebenfalls die auf dem unmodifizierten CPC stark eingeschränkte osteogene Differenzierung der Zellen: in Abbildung 4.21 (rechts) ist zu erkennen, dass die ALP-Aktivität der OS^+ -Zellen auf CPC innerhalb von 21 Tagen kaum zunahm und selbst an ihrem Maximum an Tag 14 lediglich ~50 % der auf Sr-haltigen Zementen gemessenen Enzymaktivität erreichte. Dagegen war die ALP-Aktivität auf A- und S-Typ-Zementen bereits an Tag 7 gegenüber der Kultivierung auf CPC deutlich erhöht. An den Tagen 14 und 21 wurden auf diesen Proben rund 65–95 % des für die Kontrollgruppe (PS) gemessenen Wertes erreicht. Die osteogene Differenzierung der Zellen war folglich auf CPC deutlich verzögert, auf A- und S-Typ-Zementen jedoch nahezu unein-

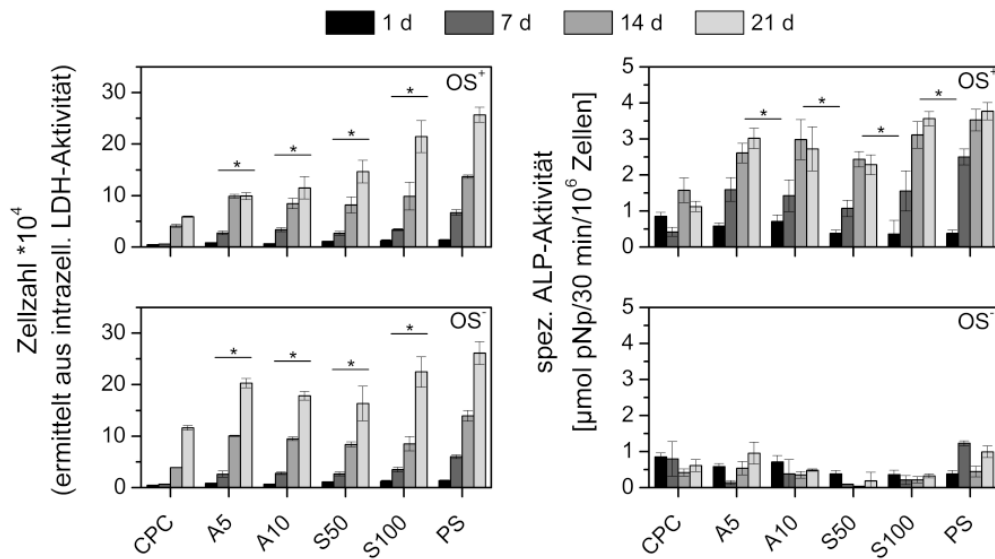


Abb. 4.21: Proliferation (links) und osteogene Differenzierung (rechts) von hMSC auf CPC und Sr-modifizierten Zementen.

geschränkt fortgeschritten, was auf eine deutliche Stimulation der Osteogenese durch die Sr-Modifikation hinweist.

Die hier exemplarisch an einem der drei durchgeführten Experimente gezeigten Ergebnisse wurden mit Zellen zweier weiterer Spender (Spender 41 und 315) bestätigt. Unabhängig von der spenderspezifischen Proliferationsrate der Zellen zeigte sich zu allen Zeitpunkten auf CPC eine Abnahme der Zellzahl um ca. 75 % gegenüber den auf PS kultivierten Zellen (Abb. 4.22). Auf A- und insbesondere S-Typ-Zementen war der Unterschied der Zellzahl gegenüber den auf PS kultivierten Zellen und damit die Beeinträchtigung der Proliferation auf dem Material geringer. Auffällig ist auch hierbei die für Zellen unter OS^- -Bedingungen vergleichsweise höhere Proliferation, die sich durch die in OS^+ -Proben einsetzende osteogene Differenzierung verminderte Proliferationsrate erklären lässt [126]. Die Material-abhängigen Unterschiede waren, insbesondere für S-Typ-Zemente sowie zu späteren Zeitpunkten, für eine Mehrheit der untersuchten Proben statistisch signifikant, so dass insgesamt eine verbesserte Proliferation der auf Strontium-Zementen kultivierten Zellen gegenüber der CPC-Kontrollgruppe festgestellt werden konnte⁴.

⁴ Eine detaillierte Übersicht zur statistischen Analyse findet sich im Anhang, Tab. A.2.

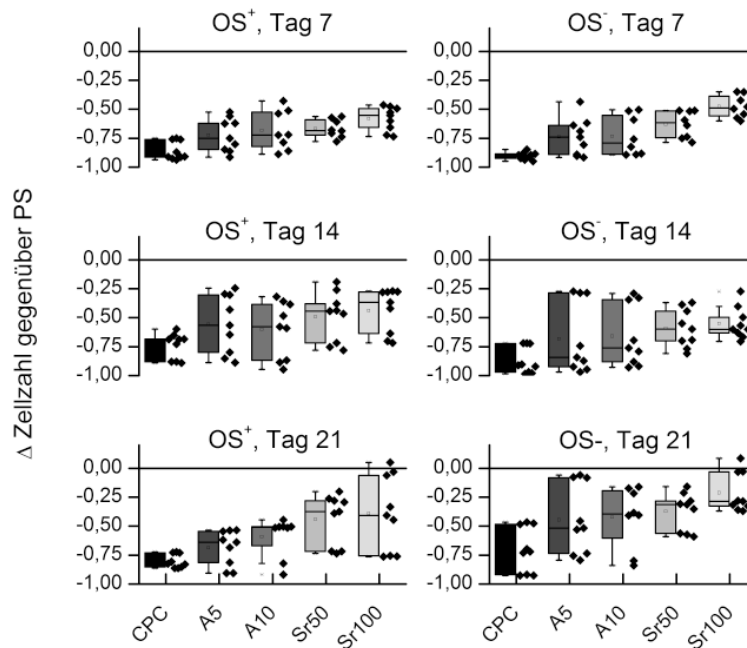


Abb. 4.22: Zusammenfassung der relativen Änderung der Zellzahl auf CPC und Sr-modifizierten Zementen gegenüber PS für alle drei untersuchten Spender.

Ein Vergleich der 3 Experimente bezüglich der osteogenen Differenzierung zeigt ebenfalls einen eindeutigen Vorteil der Sr-Zemente (Abb. 4.23). Während an Tag 7 aufgrund der insgesamt geringen ALP-Aktivität noch kaum systematische Unterschiede zu erkennen waren, zeigte sich an den Tagen 14 und 21 eine verglichen mit CPC höhere Enzymaktivität bei hMSC-Kulturen auf A- und S-Typ-Zementen. Auf einzelnen S100-Proben wurden sogar höhere Aktivitäten als auf PS gemessen, was für eine beinahe unbeeinflusste Differenzierung der Zellen auf diesem Material spricht.

Bei der Untersuchung der ALP-Expression auf RNA-Ebene dagegen waren entsprechende Trends kaum zu erkennen (Abb. 4.24). Dabei ist anzumerken, dass die Ausbeute an Gesamt-RNA (nach Isolierung von den zellbesiedelten Zementproben) aufgrund der aus früheren Studien bekannten hohen Bindungskapazität der Zemente für Nukleinsäuren äußerst gering war, was eine verlässliche Interpretation der Ergebnisse erschwerte. Deutlich wird allerdings, dass bereits an Tag 7 und insbesondere an den Tagen 14 und 21 die für ALP codierende mRNA unter OS⁺-Bedingungen verstärkt exprimiert wurde, was der Erwartung entspricht. Dies gilt auch für die Kultivierung auf CPC, obwohl an-

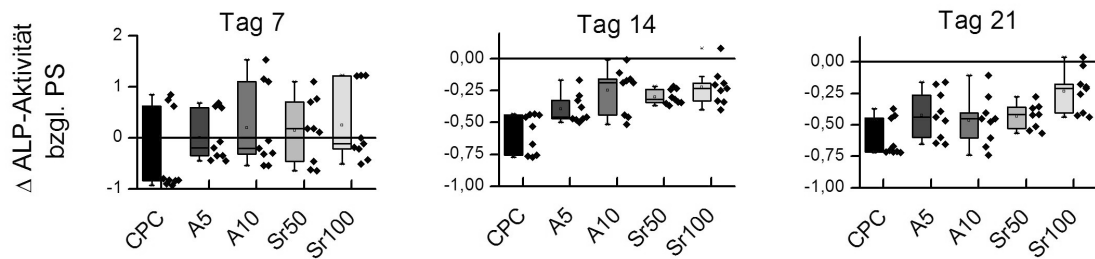


Abb. 4.23: Zusammenfassung der relativen Änderung der spezifischen ALP-Aktivität von auf CPC und Sr-modifizierten Zementen kultivierten hMSC (OS⁺) gegenüber dem Referenzmaterial PS für alle drei untersuchten Spender.

hand der biochemischen Quantifizierung der ALP-Aktivität eine schwächere Expression als auf den Sr-haltigen Materialien zu erwarten gewesen wäre. Auffällig sind dagegen die Ergebnisse auf CPC an Tag 21: sowohl in OS⁺- als auch OS⁻-Kulturen war eine deutliche Herabregulierung zu verzeichnen.

Dagegen zeigte der zweite untersuchte, späte Differenzierungsmarker BSPII, ein charakteristisches Strukturprotein der mineralisierten Knochenmatrix, ein eindeutigeres Bild: Nach einer beginnenden Hochregulierung der Expression an Tag 7, beinahe vergleichbar mit der für hMSC-Kulturen auf PS gemessenen, zeigten alle Zellen auf Sr-haltigen Zementen an Tag 14 eine deutlich erhöhte BSPII-Expression. Auf S-Typ-Zementen, insbesondere auf S50, war bereits an Tag 7 eine deutliche Steigerung der Expression erkennbar, was auf eine fortgeschrittene osteogene Differenzierung hindeutet.

Die im direkten Materialkontakt beobachteten Effekte entsprechen damit weitgehend den zuvor beschriebenen Ergebnissen der indirekten Zellkultur: auch hier stellte sich die Sr-Modifikation der Zemente als für die zelluläre Reaktion vorteilhaft heraus (vgl. Kap. 4.2.2).

In vitro-Untersuchungen zur Osteogenese auf vergleichbaren, Strontium-haltigen Apatitzementen sind in der Literatur kaum beschrieben. In einer Studie von Tadier *et al.* wird die Kultivierung von hMSC im direkten Kontakt mit auf einem DCPD/CaCO₃-Precursor basierenden Zementen, welchen SrCO₃ in fester oder flüssiger Form beige-mischt wurde, beschrieben [127]. Diese Zemente zeigten jedoch im Gegensatz zu den hier entwickelten Materialien eine sehr hohe initiale Sr²⁺-Freisetzung (*initial burst*), weshalb durch die regelmäßigen Mediumswechsel vermutlich nach einigen Tagen nur noch

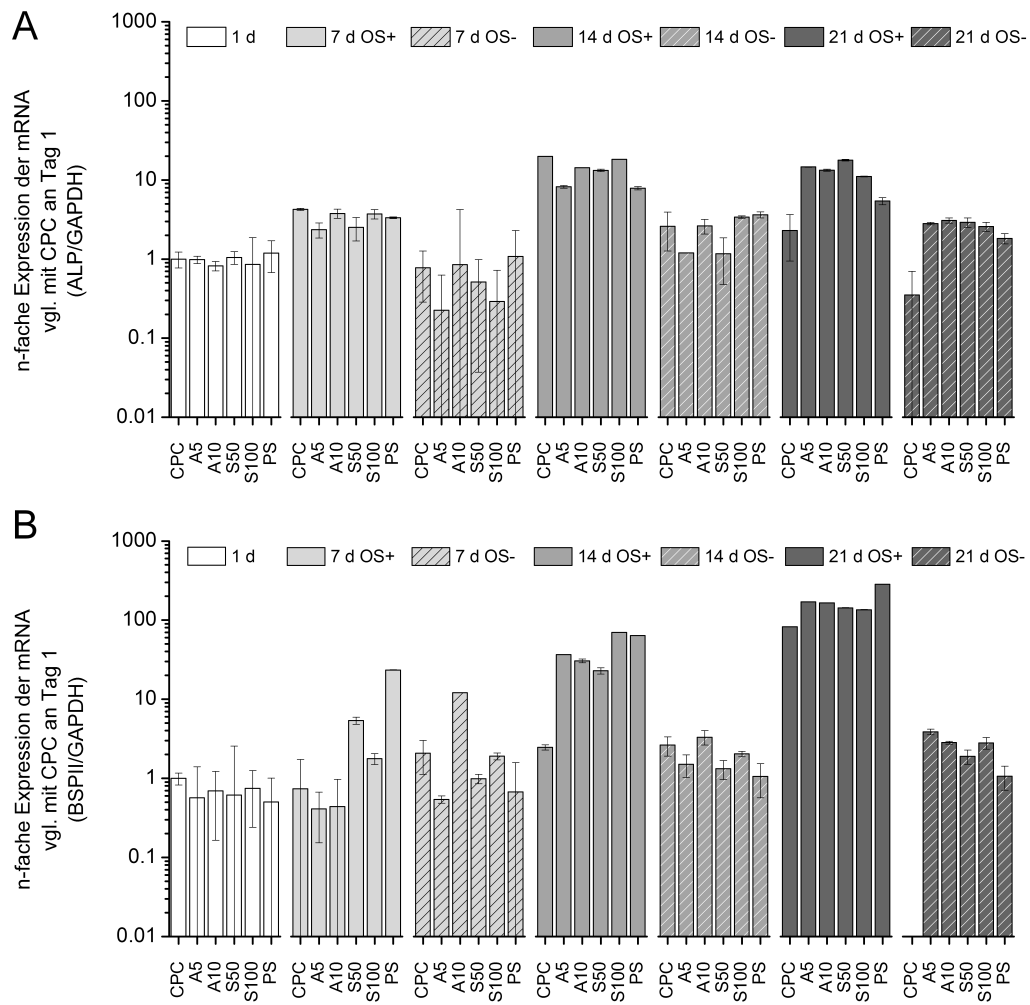


Abb. 4.24: Relative Expression der für ALP (A) und BSP/II (B) codierenden mRNA von auf CPC und verschiedenen Strontium-modifizierten Zementen unter OS⁺ und OS⁻-Bedingungen kultivierter hMSC.

äußerst geringe Sr-Konzentrationen *in vitro* vorherrschten. Dennoch wurde auf den mit festem SrCO_3 modifizierten, dem hier verwendeten A-Typ ähnlichen Zementen eine verbesserte Proliferation der Zellen beobachtet. Die osteogene Differenzierung wurde nur anhand der Expression von Osteocalcin und ALP auf mRNA-Ebene untersucht, wobei keine signifikanten Änderungen festgestellt wurden. Für einen auf α -TCP basierenden, jedoch auch Polymere enthaltenden Zement wurde von Panzavolta *et al.* eine leicht erhöhte ALP-Aktivität und eine leichte Steigerung der Expression von Osteocalcin und Produktion von Osteoprotegerin beschrieben [95]. Für den von Guo *et al.* entwickelten, auf TTCP, DCPA, und SrHPO_4 basierenden Apatit-Zement wurde lediglich dessen Cytokompatibilität bestätigt [79]. Sr-haltige Bruschitzemente, welche weitaus schneller degradieren und entsprechend eine höhere, konstante Sr-Freisetzungskinetik besitzen, zeigten sich *in vitro* hinsichtlich der Proliferation oder metabolischen Aktivität der Zellen ebenfalls keine Vorteile gegenüber Sr-freien Varianten [86].

Ein direkter Vergleich dieser Studien mit den hier beschriebenen Daten ist aufgrund der verschiedenen Zementssysteme, welche unterschiedliche ionische Interaktionen mit dem Medium (besonders Sr^{2+} -Freisetzung, Ca^{2+} -Konzentration und pH-Wert), Rauheiten, Porositäten etc. bedingen, nicht möglich, auch weil zumeist lediglich Daten direkter Zellkultursysteme beschrieben wurden. Dennoch wurde in keinem Fall eine erhöhte Cytotoxizität oder eine die osteogene Differenzierung hemmende Wirkung einer Modifizierung beschrieben.

4.3 *In vitro*-Charakterisierung der Osteoklastogenese

Die Untersuchungen zur Osteoklastogenese wurden, ähnlich wie zuvor die zur Osteogenese, in mehreren Stufen durchgeführt: Zunächst wurde der Einfluss verschiedener Sr^{2+} -Konzentrationen auf die Bildung von Osteoklasten aus primären humanen Monozyten, anschließend die Osteoklasten-Bildung und die Resorption der Zemente in direkter Kultur untersucht.

Osteoklasten (bzw. Osteoklasten-artige Zellen) wurden durch Stimulation humaner primärer Monozyten, welche aus *buffy coats* isoliert wurden, mit den Cytokinen RANKL und M-CSF erhalten. In Abbildung 4.25 ist zu sehen, wie sich unter Einfluss von M-CSF (*ab initio* im Medium enthalten) aus kleinen, kugelförmigen Monozyten (A) zunächst Kolonien bildeten (B), deren Zellen anschließend unter Einfluss von M-CSF und RANKL zu Osteoklasten fusionierten. Gut erkennbar sind die flächige Morphologie der auf Polystyrol über 100 μm großen Zellen sowie deren Mehrkernigkeit (C).

Deutlich zu erkennen ist ebenfalls, dass an Tag 9 neben den gebildeten Osteoklasten auch noch andere Zellen in der Kultur vorhanden waren, bei denen es sich aufgrund ihrer spindelförmigen Morphologie wohl nicht um Monozyten oder Osteoklasten handelte. Obwohl durch den Präparationsprozess theoretisch keine anderen, adhärent wachsenden Zellen in der gewonnenen PBMC-Fraktion enthalten sein dürften, wurden diese Zellen bei allen durchgeführten Präparationen beobachtet. Weiterhin sind kleine runde, nur wenig adhärente Zellen erkennbar, deren Typ nicht näher bestimmt werden konnte.

Aufgrund der Ergebnisse der Materialcharakterisierung sowie der *in vitro*-Experimente zur Osteogenese, welche sowohl eine höhere Festigkeit als auch verbesserte *in vitro*-

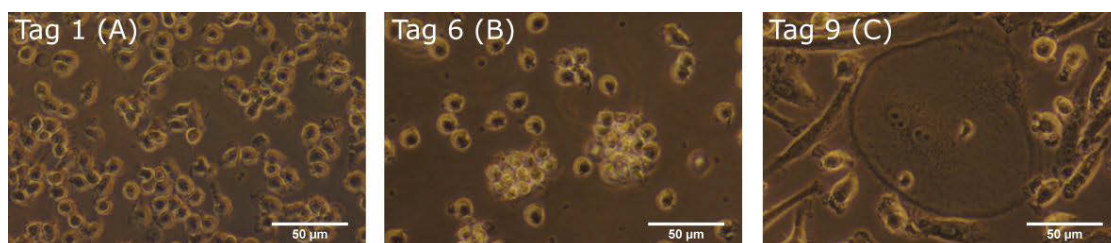


Abb. 4.25: Lichtmikroskopische Aufnahmen der *in vitro*-Osteoklastogenese: undifferenzierte Monozyten (A), Koloniebildung (B) und mehrkerniger Osteoklast (C).

Eigenschaften für S-Typ-Zemente ergaben, wurden Untersuchungen zur Osteoklastogenese lediglich auf CPC und S-Typ-modifizierten Zementen durchgeführt. Ziel der Sr-Modifizierung war dabei ausdrücklich nicht, die Osteoklastogenese zu unterbinden; vielmehr ist die Bildung reifer Osteoklasten für ein intaktes Signalling von Osteoklasten und Osteoblasten und damit für die Remodellierung des Knochens unabdingbar und sollte im Fall einer Osteoporose lediglich reduziert werden. Wünschenswert dagegen ist im Fall der angestrebten Versorgung osteoporotischer Knochendefekte eine Verminderung der tatsächlichen osteoklastären Resorption.

Bedingt durch die Entstehung osteoklastärer Zellen durch Fusion mononukleärer Vorläuferzellen und der daraus folgenden Mehrkernigkeit der Zellen ist eine Ableitung der Zellzahl aus dem DNA-Gehalt und eine Korrelation der Zellzahl mit der intrazellulären LDH-Aktivität wie im Fall der hMSC nicht möglich. Entsprechend konnten die gemessenen Aktivitäten osteoklastärer Enzyme nicht auf die Zellzahl normiert werden, vielmehr wurde die Gesamt-DNA-Menge pro lysierter Probe zur Normierung herangezogen. Weiterhin wurde der während der Experimente zur Osteoklastogenese gemessene DNA-Gehalt pro well unter folgenden Gesichtspunkten betrachtet:

- Ein über die Zeit konstanter DNA-Gehalt entspricht einer konstanten Zellzahl eines Zelltyps ohne Proliferation oder Absterben einzelner Zellen, oder...
- ...einer Bildung mehrkerniger Zellen (neuer Zelltyp) ohne Proliferation oder Absterben der Vorläuferzellen oder Absterben der gebildeten Osteoklasten.
- Eine Abnahme des DNA-Gehalts deutet auf ein Absterben der ein- oder mehrkernigen Zellen hin (Apoptose).
- Eine Zunahme der DNA-Menge ist nur durch Proliferation zu erklären. Da Osteoklasten nicht zur Proliferation fähig sind, bedeutet dies eine Verunreinigung der Kultur mit anderen Zelltypen.

4.3.1 Wirkung von Sr^{2+} -Ionen auf Monozyten

Analog zur Untersuchung des Einflusses von Sr^{2+} -Ionen auf Proliferation und osteogene Differenzierung mesenchymaler Stammzellen (Kap. 4.2.1) wurde die Wirkung mit

der Freisetzung aus modifizierten Zementen vergleichbarer Sr^{2+} -Konzentrationen auf die Osteoklastogenese sowie auf die Aktivität Osteoklasten-spezifischer Enzyme untersucht.

Bis zu einer Konzentration von 1 mM SrCl_2 im Zellkulturmedium wurde über 21 Tage ein konstanter DNA-Gehalt in osteoklastär stimulierten Monozytenkulturen gemessen (Abb. 4.26). Bei höheren Konzentrationen kam es mit steigender Sr-Dosis zu einer Abnahme des DNA-Gehalts und somit wahrscheinlich zur Apoptose osteoklastärer und/oder nicht differenzierter Zellen bzw. anderer Zelltypen. Dies erscheint insofern plausibel, da vergleichbare Sr^{2+} -Konzentrationen (10 mM und darüber) auch in *lapinen* Osteoklastenkulturen als Apoptose-induzierend beschrieben wurden [54]. Entsprechend ist davon auszugehen, dass die aus den vorliegenden Zementen freigesetzten Strontiumkonzentrationen im Bereich um 0,1 mM die *in vitro*-Osteoklastogenese erlauben.

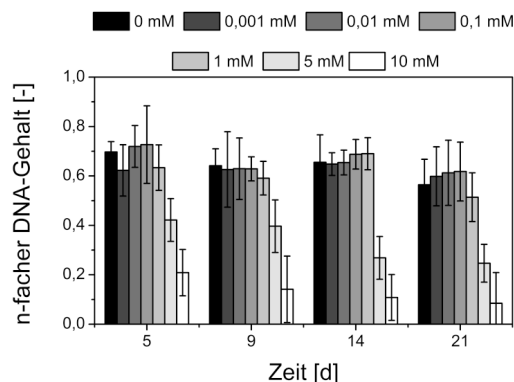


Abb. 4.26: Relative Änderung des DNA-Gehalts in osteoklastär stimulierten Monozytenkulturen während 21-tägiger Kultivierung mit unterschiedlichen Sr^{2+} -Konzentrationen.

Die Wirkung hoher Strontium-Konzentrationen auf osteoklastäre Kulturen konnte anhand lichtmikroskopischer Aufnahmen bestätigt werden: Bis einschließlich 1 mM wurde eine annähernd konfluente Besiedelung der PS-Oberflächen beobachtet (Abb. 4.27). Dabei ließen sich unterschiedliche Zellmorphologien unterscheiden: Neben spindelförmigen, in der histologischen Färbung dunkel erscheinenden Zellen wurden bereits an Tag 9 große (ca. 100 μm), mehrkernige Zellen beobachtet, die aufgrund der für Osteoklasten charakteristischen Aktivität der tartratresistenten sauren Phosphatase (TRAP, rote Färbung) als Osteoklasten identifiziert werden konnten. Bei höheren Sr^{2+} -Konzen-

trationen wurden nur noch wenige, vorwiegend spindel- bis kugelförmige Zellen vorgefunden. Somit konnte die Bildung von Osteoklasten aus Monozyten auch in Gegenwart von $< 5 \text{ mM Sr}^{2+}$ -Ionen im Medium bestätigt werden. Bei Konzentrationen von 5 mM SrCl_2 und mehr wurden keine Zellen mit Osteoklasten-ähnlicher Morphologie oder positiver TRAP-Färbung mehr beobachtet, vielmehr nahm die Zelldichte drastisch ab.

Biochemisch konnte dagegen selbst bei 10 mM SrCl_2 eine Aktivität der TRAP in den untersuchten Lysaten nachgewiesen werden (Abb. 4.28), jedoch war diese unter Einfluss von $\geq 0,1 \text{ mM Strontium}$ ab Tag 14 signifikant reduziert ($p < 0,05$). Dies kann wiederum zweierlei Ursachen haben: entweder ist die Enzymaktivität der gebildeten Osteoklasten gering (was zumindest bei $\geq 5 \text{ mM}$ aufgrund der fehlenden Zellen mit osteoklastärer Morphologie unwahrscheinlich ist), oder die Differenzierung zu TRAP-positiven Osteoklasten war stark vermindert. Unabhängig davon korreliert das Ergebnis mit einer von Bonnelye *et al.* veröffentlichten Studie, in der eine Verminderung der TRAP-Aktivität primärer *muriner* Osteoklasten bei Konzentrationen $> 0,1 \text{ mM Strontium}$ beschrieben wird. Erst bei der höchsten untersuchten Konzentration, 24 mM , wurde eine vollständige Inhibierung der TRAP beobachtet [128]. Vergleichbare Effekte erhöhter Sr-Konzentrationen wurden auch anhand einer osteoklastär stimulierten Monozytenzelllinie (*murin*, RAW 264.7) sowie primärer Monozyten aus humanem, peripherem Blut (PBMC) beschrieben [129].

Ein weiteres, für die resorptive Aktivität der Osteoklasten charakteristisches Enzym, die Carbonanhydrase II (CAII), zeigte auch bei Konzentrationen oberhalb $0,1 \text{ mM SrCl}_2$ keine signifikante Abnahme der Aktivität; hier kam es erst bei mehr als 5 mM zu einem inhibierenden Effekt. Vergleichbare Daten bzgl. humaner Osteoklasten sind in der Literatur nicht beschrieben, jedoch zeigen Baron *et al.* in einer Studie mit Strontiumranelat eine dosisabhängige Abnahme der CAII-Expression in osteoklastogen-stimulierten Knochenzellen aus Hühnerknochenmark [130].

Es konnte also gezeigt werden, dass Sr^{2+} -Konzentrationen, die mit den aus den hier untersuchten SrCPC freigesetzten Mengen vergleichbar sind, die Osteoklastogenese sowie die Aktivität osteoklastenspezifischer Enzyme *in vitro* signifikant beeinflussen ($p < 0,05$). Dabei kommt es jedoch zunächst nicht zu einer vollständigen Hemmung der Osteoklastogenese ($[\text{Sr}^{2+}] < 5 \text{ mM}$), was insofern von Bedeutung ist, als Osteoklasten

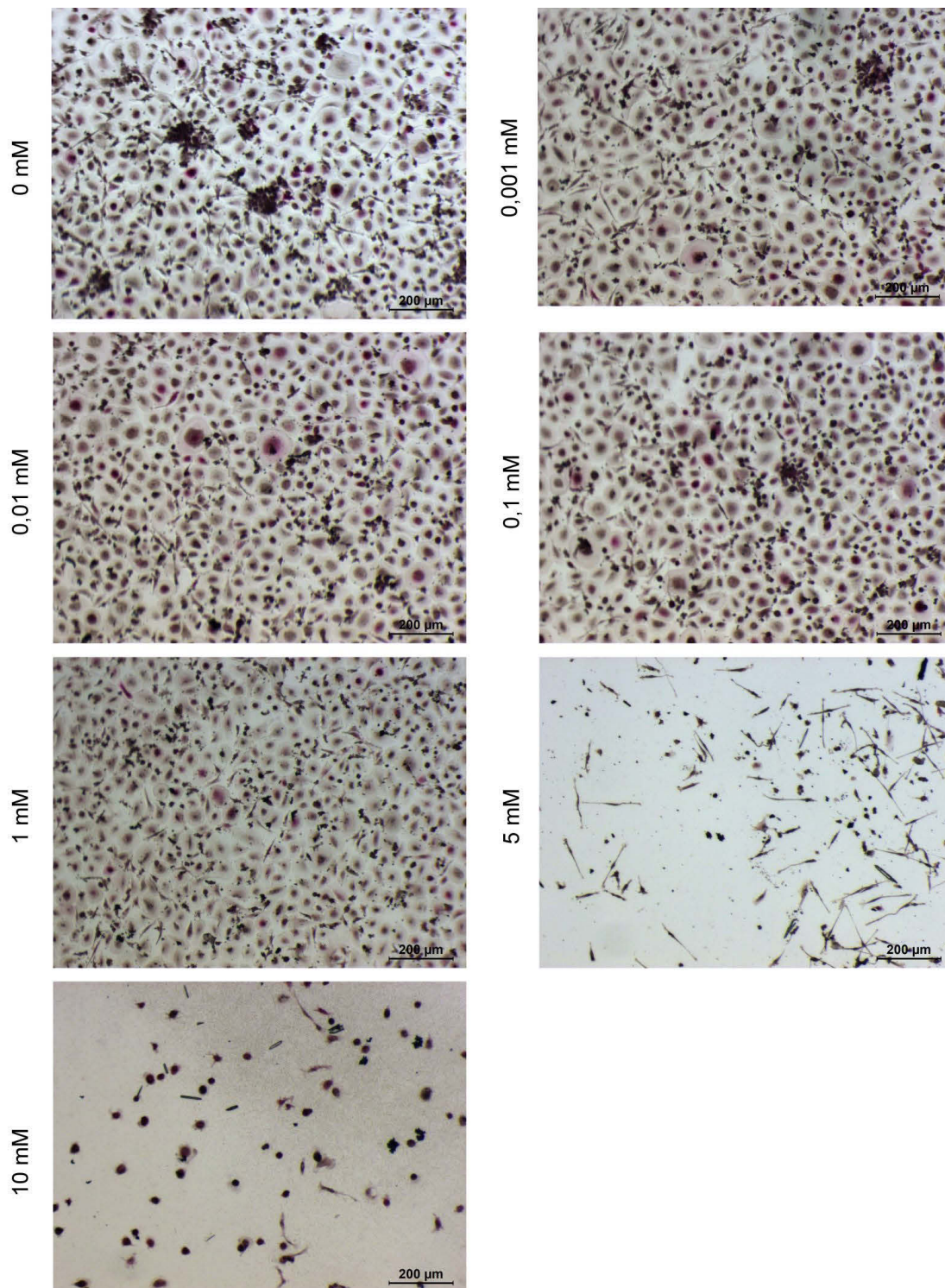


Abb. 4.27: Lichtmikroskopische Aufnahmen von osteoklastär stimulierten Zellen nach 9 Tagen unter Einfluss verschiedener Sr-Konzentrationen. Kombinierte TRAP- (rot) und Hämalaun-Färbung (Zellkerne, blau).

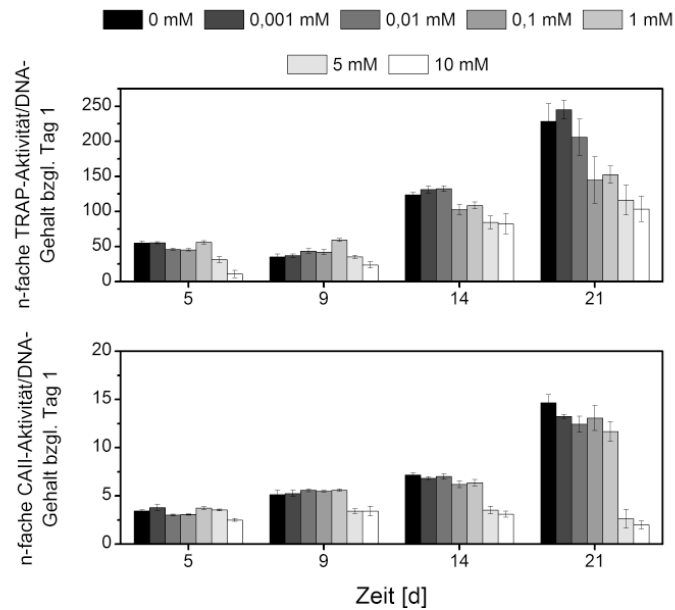


Abb. 4.28: Relative Änderung der TRAP- und CAII-Aktivität in osteoklastär stimulierten Monozytenkulturen während 21-tägiger Kultivierung mit unterschiedlichen Sr-Konzentrationen.

eine wichtige Rolle in der zellulären Kommunikation im Knochen und somit in der Regulation der osteoblastären Knochenneubildung spielen [18,56].

4.3.2 Osteoklastogenese auf Sr-modifizierten Zementen

Im direkten Materialkontakt kommt, neben der Sr^{2+} -Freisetzung und Ca^{2+} -Aufnahme durch die Zemente sowie der pH-Wert-Änderung des Mediums, auch die Oberflächentopografie der Materialien zum Tragen. Dies ist insbesondere bei der Osteoklastogenese von Bedeutung, da zur Bildung resorptionsfähiger Osteoklasten die Ausbildung einer dichten *sealing zone* gehört (vgl. Kap. 2.1.2). Im Fall extrem rauer Oberflächen, oder bei hoch mikroporösen Substraten, ist dies ggf. nicht möglich und die Osteoklastogenese bzw. resorptive Aktivität ist gestört. So beschreiben etwa Costa *et al.* eine Steigerung der Osteoklastogenese bei einer Verringerung der Rauheit von Hydroxylapatit-Schichten von $R_a = 2 \mu\text{m}$ auf $1 \mu\text{m}$ [131]. Entsprechend ist im Bereich der für CPC-, S50- und S100-Proben gemessenen Rauheit ($R_a = 0,4\text{--}0,5 \mu\text{m}$) kein negativer Einfluss auf die Osteoklastogenese zu erwarten.

Anhand fluoreszenzmikroskopischer Aufnahmen nach 9 Tagen konnten auf CPC und S100 anhand des ausgeprägten Aktinrings sowie ihrer Mehrkernigkeit osteoklastä-

re Zellen identifiziert werden (exemplarische Aufnahmen sind im Anhang, Abb. A.9 dargestellt). Daneben wurden auch zahlreiche mononukleäre Zellen beobachtet, die wahrscheinlich andere, nach der Präparation als Verunreinigung vorhandene Zelltypen darstellen. Um die Morphologie der gebildeten Osteoklasten besser beurteilen zu können, wurden auch mittels MACS gereinigte Monozyten auf CPC-, S50- und S100-Zementen über 9 und 16 Tage kultiviert und ebenso gefärbt (Abb. 4.29). Die ausgeprägte Aktinring-Bildung wurde dabei bestätigt, jedoch wurden bei dieser Präparationsmethode keine mehrkernigen Zellen gefunden.

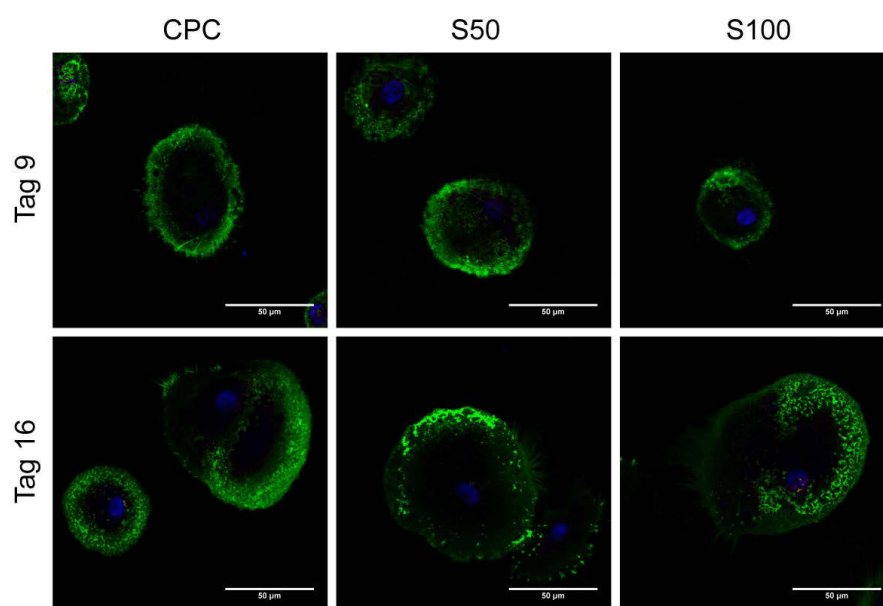


Abb. 4.29: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von Osteoklasten nach 9 (oben) und 16 Tagen (unten) Kultivierung auf CPC, S50 und S100. Aktin- (Cytoskelett, grün) sowie DAPI-Färbung (Zellkerne, blau).

Interessanterweise kommt es im Gegensatz zu den zuvor diskutierten Untersuchungen auf PS (wie auch auf der hier mitgeführten PS-Kontrollgruppe) auf den Zementen kaum zur Zunahme des DNA-Gehalts (Abb. 4.30 A). Im Unterschied zu Capuccini *et al.*, die über eine zunehmende Zellzahl auf Hydroxylapatit, aber eine Verringerung der Proliferation auf Sr-substituiertem HA berichten [132], spricht dies nach den in Abschnitt 4.3.1 angestellten Überlegungen für eine stark verminderte Proliferation nicht-osteoklastärer Zellen bzw. für eine weitgehende Fusion der auf den Zementen adhärerten Zellen zu nicht mehr teilungsfähigen Osteoklasten. Im Fall des CPC kam es zwi-

schen Tag 9 und 16 sogar zu einer starken Abnahme des DNA-Gehalts und folglich der Zellzahl. Es ist denkbar, dass dies auf die auch für hMSC beobachtete höhere Cyto-kompatibilität der S-Typ-Zemente zurückzuführen ist, aufgrund derer nicht-osteoklastäre Zellen auf dem Zement absterben, beispielsweise aufgrund der veränderten pH- und $[\text{Ca}^{2+}]$ -Verhältnisse.

Ein deutlicher Einfluss der S-Typ-Modifizierung konnte auf die Aktivität beider für die Osteoklastogenese charakteristischer Enzyme, TRAP und CAII, nachgewiesen werden (Abb. 4.30): Zwar nahm die TRAP-Aktivität auf allen untersuchten Zementen zwischen Tag 1 und 9 deutlich zu, jedoch waren die auf S50 und S100 gemessenen Aktivitäten gegenüber CPC deutlich geringer. An Tag 16 wiederum wurde auf S50 eine tendenziell erhöhte Aktivität gemessen, während auf CPC die Aktivität wieder abnahm und auf S100 weitgehend unveränderte Werte gemessen wurden. Aufgrund der großen Unterschiede zwischen den Zellen der beiden untersuchten Spender waren diese Trends jedoch nicht signifikant. Als Ursache für den unterschiedlichen Einfluss von CPC und Sr-haltigen Zementen kommt neben der Sr^{2+} -Freisetzung, deren Effekt im vorausgehenden Abschnitt beschrieben wurde, auch die im Überstand der Zemente veränderte Ca^{2+} -Konzentration in Frage. Wie in der Literatur beschrieben beruht die Wirkung beider Ionen auf Osteoklasten bzw. deren Bildung unter anderem auf der Interaktion von Ca^{2+} -Ionen mit dem CaSR (*calcium sensing receptor*) [52]. Dadurch sind hier sowohl synergistische (verminderte Ca^{2+} -Konzentration und Hemmung des CaSR durch Sr^{2+}) als auch gegenläufige Effekte (Ausgleich des Ca^{2+} -Mangels durch Sr^{2+}) denkbar. Schließlich ist auch der geringere Einfluss der S-Typ-modifizierten Zemente auf den pH-Wert von Bedeutung: Wie von Schilling *et al.* gezeigt, verringert sowohl ein pH-Wert ober- als auch unterhalb 7,1 signifikant die Zahl der *in vitro* gebildeten Osteoklasten [133]. Insofern wäre die Osteoklastogenese auf S50 und S100 gegenüber CPC auch in dieser Hinsicht begünstigt (vgl. Abb. 4.5).

Unabhängig von solchen Überlegungen wurden auf allen untersuchten Zementen die Enzyme TRAP und CAII nachgewiesen, was auf die Genese prinzipiell resorptionsfähiger Osteoklasten hindeutet. Entsprechend wurde anschließend die tatsächliche Resorption der Zemente untersucht.

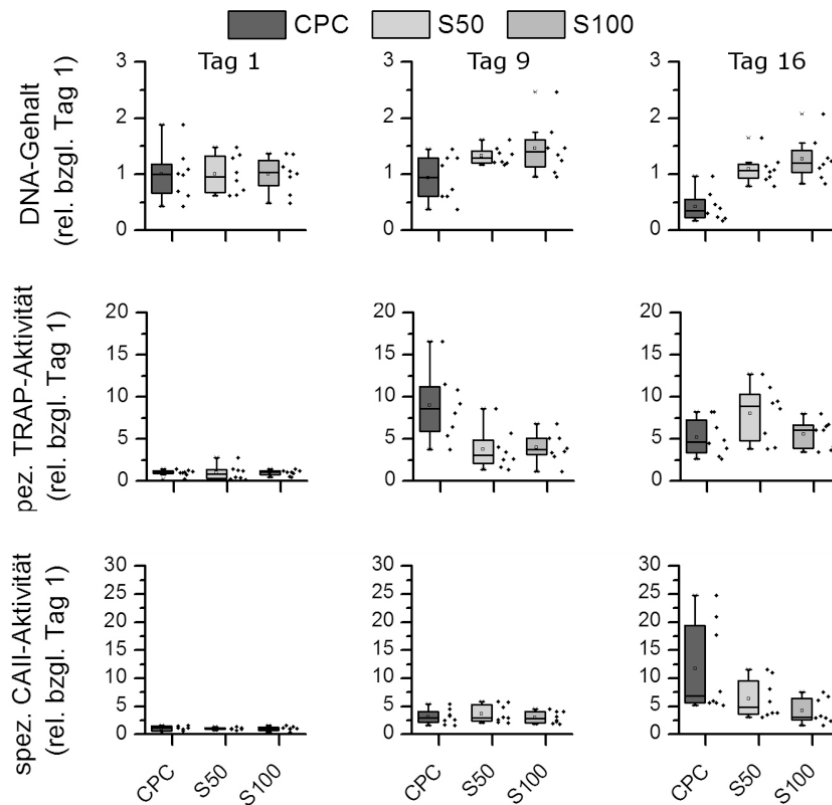


Abb. 4.30: Relative Änderung von DNA-Gehalt sowie der spezifischen TRAP- und CAII-Aktivität während der Osteoklastogenese auf CPC, S50- und S100-Zementen.

Anhand von REM-Aufnahmen von Zementen, von denen die darauf kultivierten Osteoklasten entfernt wurden, zeigten sich tatsächlich Spuren osteoklastärer Resorption: In Abbildung 4.31 (links) ist zu erkennen, dass sich auf CPC bereits an Tag 9 erste Anzeichen zur Bildung von Lakunen finden, obwohl die zelluläre Resorption von CD-HA in der Literatur als sehr gering beschrieben wird. Grossardt *et al.* dokumentieren innerhalb von 13 Tagen die Resorption von 0,01 % des eingesetzten HA-Zements nach Inkubation mit durch RANKL stimulierten RAW 264.7-Zellen – wenig im Vergleich mit Buschit- oder Monetit-Zementen [134]. An Tag 16 waren auf allen Materialien deutliche Resorptionsspuren vorhanden (Abb. 4.31, rechts). Hier ließ sich ein eindeutiger Einfluss der Sr-Modifikation feststellen: während auf CPC zahlreiche deutlich ausgeprägte, tiefe Lakunen gefunden wurden, waren deren Zahl und Tiefe auf S50 und insbesondere S100 deutlich verringert.

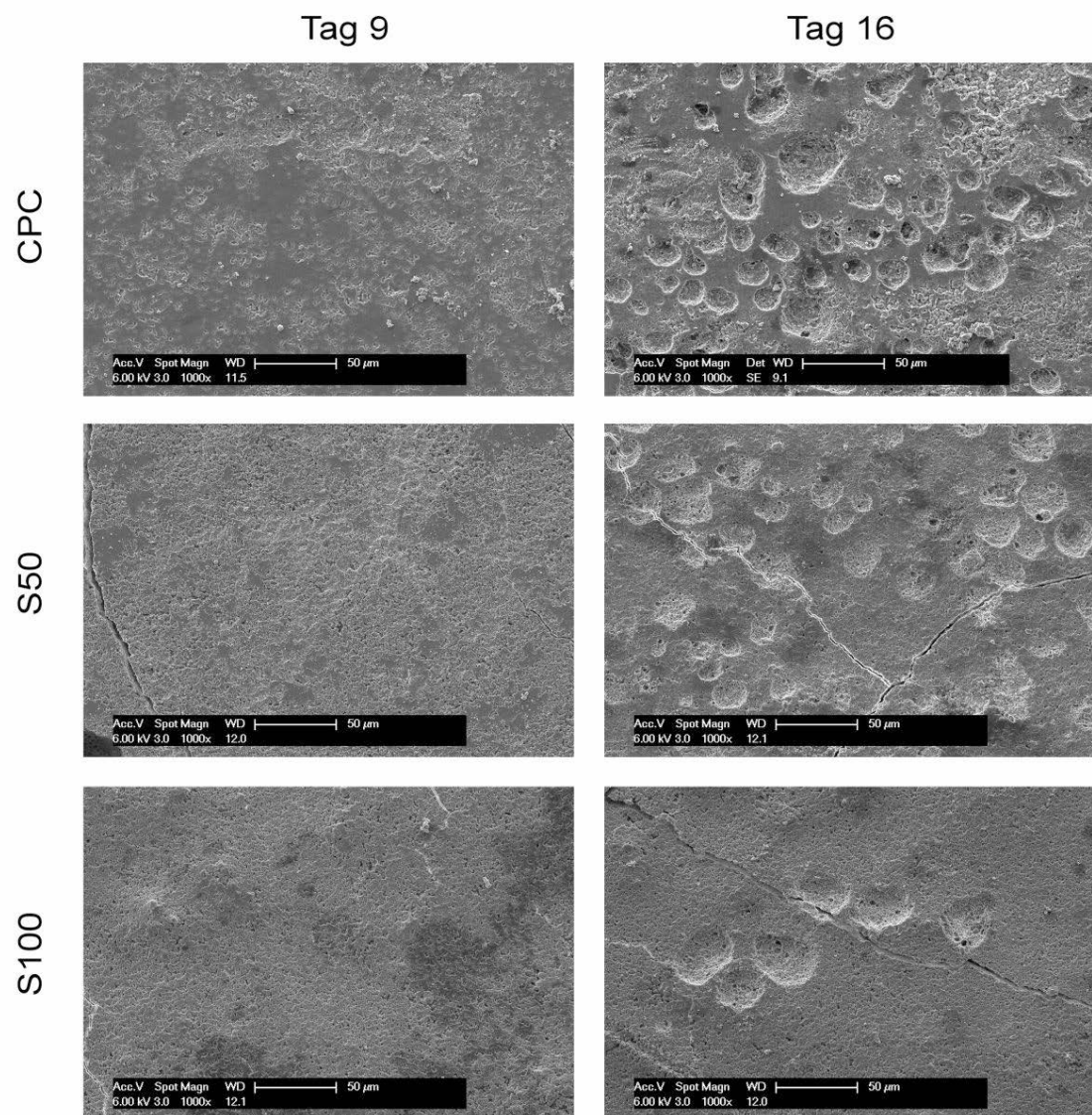


Abb. 4.31: REM-Aufnahmen von CPC-, S50- und S100-Proben nach 9 (links) und 16 Tagen (rechts) Kultivierung mit Osteoklasten nach der Zelllyse.

Studien zur osteoklastären Resorption Sr-modifizierter Calciumphosphate oder Calciumphosphatzemente sind in der Literatur bislang nicht vertreten. Lediglich Yang *et al.* beschrieben ein Zellkulturmodell, in dem die Resorption zuvor in übersättigter Lösung mineralisierter Schichten auf Polystyrol untersucht wurde. Hierbei wurde gezeigt, dass Mineralschichten mit einem Sr/Ca-Verhältnis im Bereich von 0–0,7⁵ mit zunehmendem Sr-Gehalt nach 40-stündiger Inkubation weniger Resorptionslakunen aufwiesen [135].

Die hier gefundene Abnahme der osteoklastären Resorption von S50- und S100-Zementen im Vergleich zu unmodifiziertem CPC bestätigt einen direkten Effekt der Modifizierung auf die osteoklastäre Aktivität. Da es nicht zu einer Abnahme des DNA-Gehalts (Abb. 4.26), welche für eine Sr-induzierte Apoptose sprechen würde [54], kam und auch keine morphologischen Änderungen beobachtet wurden (Abb. 4.29), scheint eine direkte Wirkung der Sr-Modifikation auf die Resorptionsaktivität vorzuliegen. Diese Annahme wird gestützt durch den für Osteoklasten, die auf S-Typ-Zementen kultiviert wurden, gemessenen Aktivitätsverlauf der an der Resorption beteiligten Enzyme TRAP und CAII: die vorhandene Aktivität beider Enzyme belegt die Genese funktionaler Osteoklasten, deren gegenüber CPC verändertes zeitliches Muster jedoch auch den Einfluss des Strontiums. Dies deutet darauf hin, dass die eingangs formulierte Forderung, für das *bone signalling* wichtige, funktionale Osteoklasten zwar zu erhalten, deren resorptive Aktivität jedoch zu vermindern, von den entwickelten S-Typ-Zementen erfüllt wird.

⁵Für A5- und A10-Zemente beträgt das Sr/Ca-Verhältnis 0,08 bzw. 0,16, für S50- und S100-Zemente 0,13 bzw. 0,27. Die in dieser Arbeit beschriebenen Zemente weisen also geringere Sr-Gehalte auf als das von Yang *et al.* beschriebene Material.

5 Ergebnisse weiterer Kooperationsstudien

Die in dieser Arbeit entwickelten Strontium-modifizierten Knochenzemente wurden von mehreren kooperierenden Arbeitsgruppen im Rahmen des Sonderforschungsbereichs Transregio 79 mit ganz unterschiedlichen Zielsetzungen und Methoden untersucht, wobei sich äußerst interessante Resultate ergaben. Zwei dieser Studien sollen im Folgenden kurz vorgestellt werden.

Strontium-modifizierte CPC stimulieren die Knochenneubildung in einem osteoporotischen *in vivo*-Defektmodell

Der entwickelte Sr-haltige Knochenzement S100 wurde in einer *in vivo*-Studie im Labor für Experimentelle Unfallchirurgie der Justus-Liebig-Universität Gießen in einem metaphysären Knochendefekt im osteoporotischen Ratten-Modell implantiert [136]. Die Tiere, 45 weibliche Sprague-Dawley Ratten, wurden dabei zunächst beidseitig ovariectomiert (OVX) und erhielten für 3 Monate eine spezielle, u. a. Ca^{2+} -, PO_4^{3-} - und Vitamin D-arme Diät, was zu einem osteopenischen Knochenstatus führte. Als Defektmodell wurde ein 4 mm großer, keilförmiger Defekt in der distalen Metaphyse präpariert und im Fall der Kontrollgruppe (Leerdefekt) lediglich mit einer Osteosyntheseplatte fixiert [137]. Dies ähnelt einer bei Osteoporose gängigen Fraktursituation – insbesondere bei Stürzen kommt es durch Abstützen mit den Händen bei Patienten häufig zu metaphysären Frakturen. In den beiden experimentellen Gruppen wurden die gesetzten Defekte mit CPC (als Vergleichsgruppe) und S100-Zement gefüllt (Abb. 5.1). Nach einer Standzeit von 6 Wochen wurde das Defektareal mittels Histologie, Histomorphometrie und ToF-SIMS untersucht.

Mit Hilfe der Flugzeit-Massenspektrometrie (ToF-SIMS, siehe Kap. 3.2.4) konnte gezeigt werden, dass aus dem S100-Zement freigesetztes Strontium in unmittelbarer Nähe des Zements, also im Bereich der Knochenneubildung, aber auch in bis zu 6 mm Distanz

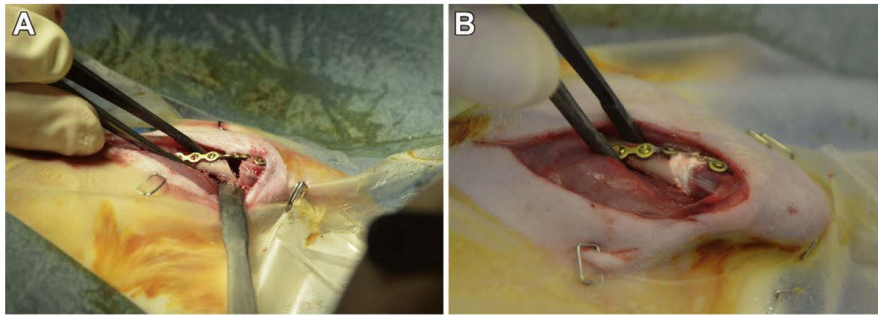


Abb. 5.1: Implantation des entwickelten S100-Zements in einen metaphysären *critical-size-defect* im distalen Femur osteoporotischer Ratten: Leerdefekt (A) und mit Zement gefüllter Defekt (B). Abbildung aus: [136].

zum Material nachweisbar war. Das Konzept der lokalen Freisetzung von Sr^{2+} -Ionen direkt in den Knochendefekt bzw. in das an der Heilung beteiligte umliegende Gewebe wurde also bestätigt. Weiterhin konnte in der S100-Gruppe eine gegenüber CPC erhöhte Knochenneubildung im Bereich des Gewebe-Material-Kontaktes sowie im gesamten Defektbereich, in der Immunhistologie eine stark positive BMP-2-Färbung sowie eine verstärkte Expression von Osteoprotegerin und Osteocalcin bei gleichzeitiger Verminderung der RANKL-Expression nachgewiesen werden. Dies spricht für eine die Knochenneubildung stimulierende Wirkung der Sr-Modifikation bei gleichzeitig intaktem *bone signalling*, jedoch bei herabregulierter osteoklastärer Resorption. Interessanterweise wurde auch eine höhere Anzahl TRAP-positiver Zellen im Bereich des Sr-haltigen Materials gefunden – es kommt also nicht zum Absterben der für das *bone signalling* wichtigen osteoklastären Zellen. Somit konnte die Eignung des S100-Zements für die Versorgung osteoporotischer Knochendefekte sowie dessen die Osteogenese stimulierende Wirkung bei gleichzeitiger Beibehaltung einer funktionierenden Zell-Zell-Kommunikation auch *in vivo* bestätigt werden. Es wurde jedoch ebenfalls deutlich, dass beide Zemente innerhalb des Untersuchungszeitraums kaum resorbiert wurden.

ToF-SIMS-Analysen der Zellreaktion auf SrCPC

Im Gegensatz zu anderen Analysemethoden wie beispielsweise EDX bietet die Untersuchung mittels ToF-SIMS die Möglichkeit einer dreidimensional aufgelösten Element- bzw. Molekularanalyse. Wie in Kapitel 4.1.5 gezeigt, ließ sich mittels ToF-SIMS die Verteilung der Sr^{2+} -Ionen im Zement räumlich darstellen. In Kooperation mit dem

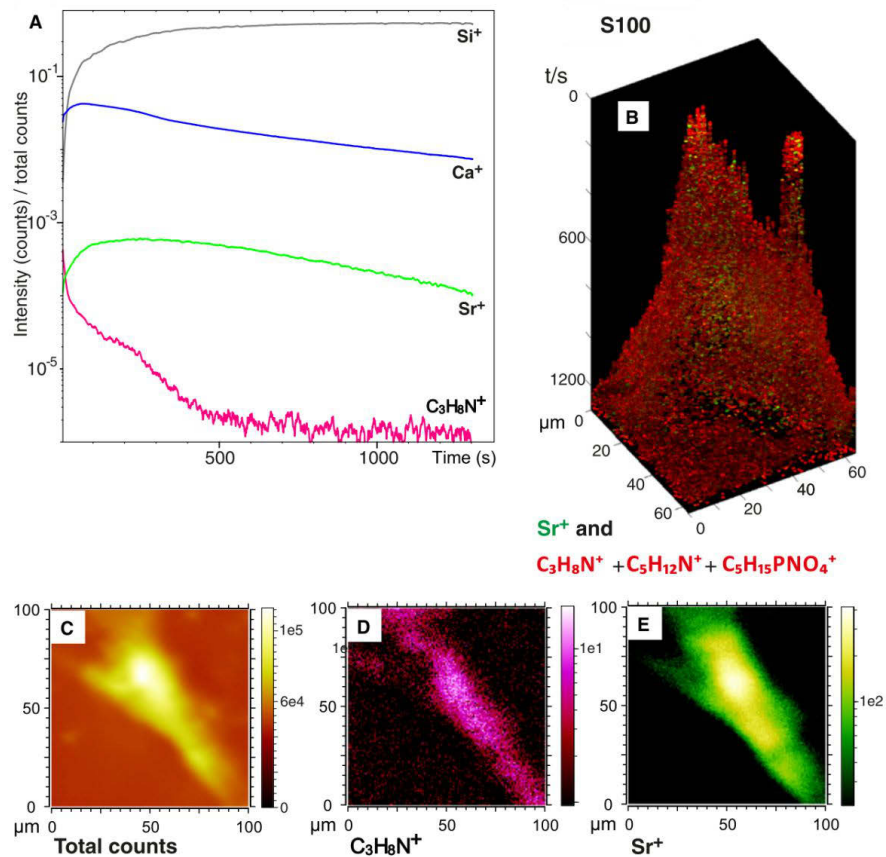


Abb. 5.2: ToF-SIMS-Analyse einer einzelnen, auf S100 kultivierten Zelle (hMSC, zur Analyse auf Si-Wafer übertragen). Anhand des Tiefenprofils (A, aufgrund des mit der Zeit fortschreitenden Materialabtrags korreliert die aufgetragene Sputterzeit dem Abstand von der Materialoberfläche) ist erkennbar, dass Sr²⁺ und Ca²⁺ in der Zelle (erkennbar als C₃H₈N⁺-Signal) akkumuliert sind. Dies ist auch in der 3D Rekonstruktion (B) als auch den Darstellungen der lateralen Elementverteilung (C-E) zu erkennen. Nach: [138].

Physikalisch-Chemischen Institut der Justus-Liebig-Universität Gießen wurden auch Untersuchungen an auf den neu entwickelten Knochenzementen kultivierten Zellen durchgeführt [138]. Dazu wurden die Zellen einerseits direkt auf den Zementen kultiviert und fixiert, andererseits nach einer gewissen Kultivierungszeit vom Zement auf Silizium-Wafer umgesiedelt, um eine vom Zement unabhängige Analyse der intrazellulären Ionenkonzentrationen zu ermöglichen.

Da auch organische Moleküle bzw. Molekülfragmente, beispielsweise das *Phosphatidylcholin* (C₅H₁₅PMO₄⁺) und seine Hauptfragmente C₅H₁₂N⁺ und C₃H₈N⁺, gut detektierbar sind, war es möglich, die Einlagerung von Sr²⁺-Ionen aus dem Medium (bei

Kultivierung mit SrCl_2 -haltigem α MEM) bzw. aus dem Material (direkte Kultur auf A10- und S100-Proben) in die von Osteoblasten gebildete mineralisierte extrazelluläre Matrix darzustellen (Abb. 5.2). Dabei konnte gezeigt werden, dass Sr^{2+} -Ionen in die mineralisierte Matrix integriert werden, allerdings nicht homogen, sondern teilweise lokal angereichert. Eine Erklärung für dieses Phänomen konnte bislang nicht gefunden werden.

Darüber hinaus wurde ein interessanter Hinweis auf den Mechanismus der Sr^{2+} -Einlagerung in das extrazelluläre Mineral gefunden: im Medium vorhandene oder aus dem Zement freigesetzte Sr^{2+} -Ionen wurden von zu Osteoblasten differenzierenden hMSC aufgenommen und intrazellulär akkumuliert, wobei die Menge des in der Zelle nachgewiesenen Strontiums von dessen Konzentration im Medium abhing. Dies könnte auf einen Vesikel-gesteuerten Mineralisierungsmechanismus der ECM hindeuten [139].

6 Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war die Herstellung und Charakterisierung Strontium-haltiger Knochenzemente auf Basis eines etablierten Calciumphosphat-Knochenzements, welche durch kontrollierte Freisetzung zweiwertiger Strontiumionen (Sr^{2+}) *in vitro* wie *in vivo* die zelluläre Knochenneubildung unterstützen. Gleichzeitig sollte durch die freigesetzten Sr^{2+} -Ionen die osteoklastäre Resorption des Zements, nicht jedoch die Osteoklastogenese als solche, inhibiert werden. Darüber hinaus sollte der Zement eine für die Verwendung in typischen Knochendefekten geeignete Handhabbarkeit und eine dem spongiösen Knochen vergleichbare Festigkeit besitzen.

Zementherstellung und materialwissenschaftliche Charakterisierung

Zur Modifizierung des Ausgangsmaterials, eines α -Tricalciumphosphat-basierten, zu Hydroxylapatit abbindenden Zements (CPC), wurden drei Ansätze gewählt: die Beimischung von Strontiumcarbonat (SrCO_3) und ggf. zusätzlich Dicalciumphosphat (DCPD) zum Ausgangszement (A- bzw. B-Typ-Modifizierung) sowie die Substitution der Zementkomponente CaCO_3 durch SrCO_3 (S-Typ). Gegenüber den meisten in der Literatur beschriebenen Strontium-haltigen Calciumphosphatzementen stellt dies eine vereinfachte Herangehensweise dar, da keine aufwändigen Schritte zur Synthese Sr-haltiger Precursor-Phasen (etwa Hochtemperaturbehandlungen oder Fällungsreaktionen) notwendig sind und zudem eine Variation des Sr-Gehalts im Zement leicht möglich ist. Alle drei Ansätze resultierten in gut handhabbaren Zementpasten, deren Abbindeigenschaften sich durch die jeweilige Modifikation mit der Strontiumphase SrCO_3 jedoch deutlich voneinander unterschieden. Durch Anpassung der pro Masse eingesetzten Flüssigkeitsmenge (l/p-Verhältnis) konnte für alle Modifikationen eine initiale Abbindezeit (t_i) innerhalb der für die Verarbeitung von Calciumphosphatzementen postulierten Zeitspanne von $3 \leq t_i \leq 8 \text{ min}$ [106, 107] realisiert werden. Aufgrund einer deutlichen

Verschlechterung der Zementeigenschaften, insbesondere der Druckfestigkeit, erwies sich die B-Typ-Modifizierung während der weiteren Charakterisierung jedoch als ungeeignet und wurde nicht weiter verfolgt.

A- und S-Typ-Modifikation des CPC führten jeweils zu prinzipiellen Unterschieden zwischen den Zementen (Abb. 6.1):

A-Typ-Zemente bildeten während dem Abbinden eine Sr^{2+} -arme Apatit-Matrix aus Ca-defizitärem Hydroxylapatit (CDHA) mit eingelagerten SrCO_3 -Kristalliten, welche auch während längerer Auslagerung der Zemente (bis zu 21 Tage) erhalten blieben. Dies hatte eine gegenüber unmodifiziertem CPC (ca. 27 MPa) verminderte Druckfestigkeit der A-Typ-Zemente von nur 12–15 MPa zur Folge, da die rund 5–8 μm großen SrCO_3 -Kristallite im Belastungsfall rissauslösend wirkten. Dagegen blieb die biaxiale Zugfestigkeit von der Modifikation weitgehend unbeeinflusst.

		CPC	A-Typ		B-Typ		S-Typ	
			A5	A10	B5	B10	S50	S100
Material- eigenschaften	Abbindezeit							
	Produkt	CDHA	CDHA + SrCO_3		n.b.		Sr-subst. CDHA	
	Festigkeit							
	Sr-Release	0			n.b.			

Abb. 6.1: Ergebnisse der materialwissenschaftlichen Charakterisierung: Gegenüber unmodifiziertem CPC besaßen Zemente mit SrCO_3 -Beimischung (A-Typ) eine verringerte Druckfestigkeit, setzten jedoch Sr^{2+} -Ionen in geeigneten Konzentrationen frei. Die B-Typ Modifikation (Zusatz von SrCO_3 und DCPA) erwies sich als ungeeignet. Die Substitution von Ca^{2+} durch Sr^{2+} (S-Typ-Modifizierung) führte zur Bildung eines Strontium-substituierten Zements mit verbesserten mechanischen Eigenschaften und einer kontrollierten Sr^{2+} -Freisetzung (n. b.: nicht bestimmt).

Charakteristisch für S-Typ-Zemente war hingegen eine homogene Verteilung des Strontiums in der Zementmatrix, was mit Hilfe von Elementverteilungs-Analyse (EDX) und insbesondere orts aufgelöster Massenspektrometrie (ToF-SIMS) dargestellt werden konnte. Zudem spricht die kristallographische Auswertung der Phasenzusammensetzung, bei der binnen weniger Tage das nahezu vollständige Verschwinden des enthaltenen SrCO_3 beobachtet wurde, für die Bildung Sr-haltigen Hydroxylapatits als Endprodukt

der Zementierungsreaktion. S-Typ-Zemente besaßen infolge dessen eine gegenüber unmodifiziertem CPC um bis zu 80 % gesteigerte Druckfestigkeit von maximal 57 MPa (S100 nach 7-tägiger Auslagerung in feuchter Atmosphäre). Dagegen blieb auch hier die biaxiale Zugfestigkeit im Vergleich zum Ausgangsmaterial CPC weitgehend unverändert.

Somit besaßen A- und S-Typ-modifizierte Zemente eine Druckfestigkeit vergleichbar der des spongiösen Knochens (5–15 MPa [14, 140]) oder darüber und eignen sich daher für den Einsatz als Knochenersatzmaterialien im Bereich der Spongiosa.

Bei Kontakt mit Zellkulturmedium zeigten A- wie auch S-Typ-Zemente eine Aufnahme von Ca^{2+} -Ionen durch oberflächliches Apatit-Kristallwachstum, was insbesondere im Fall der S-Typ-Zemente zu einer Glättung der Oberfläche führte. Jedoch war die daraus resultierende, für Apatitzemente typische, Verarmung an Ca^{2+} -Ionen im Auslagerungsmedium weniger ausgeprägt als im Fall des reinen CPC. Auch der für CPC charakteristische Abfall des pH-Werts im Auslagerungsmedium, bedingt durch die Freisetzung saurer Komponenten während der Hydrolyse der Precursor-Komponenten, fiel für Sr-haltige Zemente deutlich geringer aus. Für alle Sr-haltigen Zemente wurde eine innerhalb der ersten 3 Tage der Auslagerung leicht erhöhte (*initial burst*), danach jedoch weitgehend konstante Freisetzung von Sr^{2+} -Ionen festgestellt, die unter Zellkulturbedingungen zu Sr-Konzentrationen im Bereich von 0,025–0,1 mM führte. Dabei zeigten insbesondere S-Typ-Zemente eine Korrelation von Strontiumgehalt und -freisetzung, was die Möglichkeit eröffnet, die Freisetzung durch Variation des SrCO_3 -Gehalts gezielt einzustellen.

Schließlich führte die Strontium-Modifizierung zu einer Steigerung des Röntgenkontrasts der Zemente, was hinsichtlich einer so möglichen postoperativen Darstellung des mit Strontium-Zement behandelten Knochendefekts von Vorteil ist.

Charakterisierung der entwickelten Materialien *in vitro*

In vitro wurde zunächst die Wirkung von Sr^{2+} -Konzentrationen von bis zu 10 mM auf humane mesenchymale Stammzellen (hMSC) durch Zugabe von SrCl_2 zum Zellkulturmedium untersucht. Dabei zeigte sich, dass sowohl deren Proliferation als auch osteoge-

ne Differenzierung bei 0,01–0,10 mM Strontium begünstigt wird, was weitgehend den aus A- und S-Typ-Zementen freigesetzten Konzentrationen entsprach.

Weiterhin konnte sowohl im indirekten (Übertragung des konditionierten Zellkulturmediums von Zementen auf Zellen) als auch im direkten Zellversuch (Kultivierung der hMSC direkt auf den Zementen) ein positiver Effekt der Strontium-Modifikation auf die zelluläre Reaktion festgestellt werden: in beiden Kultursystemen führte die Strontium-Modifikation generell, und insbesondere die Substitution von Ca^{2+} - durch Sr^{2+} -Ionen im Zement (S-Typ), zu einer gesteigerten Proliferation und einer innerhalb der Kultivierungszeit weiter fortgeschrittenen osteogenen Differenzierung der hMSC in osteoblastäre Zellen (Abb. 6.2). Dies konnte in drei unabhängigen Experimenten mit primären Zellen dreier unterschiedlicher Spender bestätigt werden.

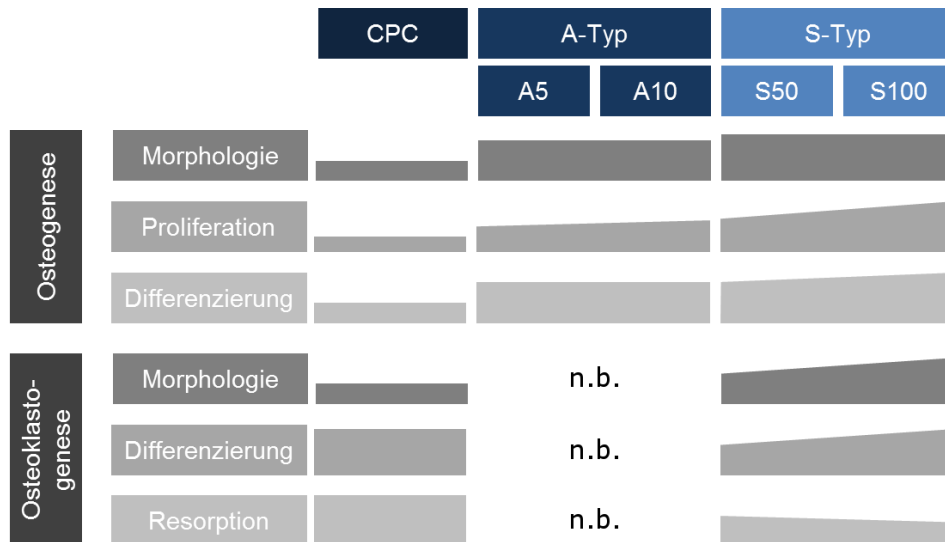


Abb. 6.2: Ergebnisse der *in vitro*-Charakterisierung: Generell bewirkte die Strontium-Modifizierung der Zemente eine Steigerung der Proliferation und osteogenen Differenzierung humaner mesenchymaler Stammzellen. Dies galt insbesondere für S-Typ-modifizierte Materialien. Die Osteoklastogenese war sowohl auf CPC als auch S-Typ-Zementen möglich, jedoch war die Aktivität spezifischer Marker verändert und insbesondere die Resorption der Sr-modifizierten Zemente vermindert.

In Experimenten mit primären humanen Monozyten wurde außerdem ein deutlicher Einfluss von Sr^{2+} -Ionen im Zellkulturmedium auf die Bildung osteoklastärer Zellen (Osteoklastogenese) gezeigt: sowohl die Ausbildung des Osteoklasten-typischen Aktin-

rings als auch die Aktivität spezifischer Enzyme wie der tartratreisistenten sauren Phosphatase (TRAP) und der Carbonhydrase II (CAII) wurde durch Strontium-Konzentrationen von mehr als 0,01 bzw. 1 mM, wiederum eingestellt durch Zugabe von SrCl_2 , deutlich reduziert. Im direkten Kontakt mit S-Typ-modifizierten Zementen kam es zwar zur Bildung osteoklastärer Zellen, jedoch war deren charakteristische Enzymaktivität gegenüber den auf unmodifiziertem CPC kultivierten Zellen entscheidend verändert: die Aktivität der TRAP erreichte erst zu späteren Zeitpunkten ein ähnlich hohes Niveau wie auf CPC, und die der CAII war innerhalb des Untersuchungszeitraums gegenüber den CPC-Kulturen generell reduziert (Abb. 6.2). Dies spiegelte sich auch in der Resorptionsaktivität wieder: während CPC nach 16 Tagen deutliche Spuren osteoklastärer Resorption aufwies, war die Größe und insbesondere die Anzahl der Resorptionslaken auf S-Typ-Zementen signifikant reduziert. Auch diese Ergebnisse konnten mit Zellen unterschiedlicher Spender reproduziert werden.

Damit ergeben sich folgende Schlussfolgerungen:

- Strontium-haltige Knochenzemente lassen sich durch Beimischung von SrCO_3 (A-Typ) zu einem etablierten, auf α -TCP basierenden und Hydroxylapatit-bildenden Pulver-Flüssigkeitszement sowie durch Substitution des darin enthaltenen CaCO_3 durch SrCO_3 (S-Typ) herstellen. Die gleichzeitige Beimischung von SrCO_3 und DCPA dagegen (B-Typ) führt nicht zu mechanisch ausreichend stabilen Materialien.
- A-Typ-modifizierte Zemente besitzen eine inhomogene Struktur aus einer Strontium-freien Apatit-Matrix mit eingelagerten SrCO_3 -Kristalliten, während S-Typ-Zemente eine homogene Matrix mit gleichmäßiger Sr^{2+} -Verteilung aufweisen.
- Es wurden zahlreiche experimentelle Hinweise darauf gefunden, dass die während des Abbindens der S-Typ-Zemente gebildete Matrix aus Sr-substituiertem Hydroxylapatit (SrHA) besteht.
- Die für Calciumphosphatzemente typische Senkung des pH-Werts bei Auslagerung in wässrigem Medium und die Aufnahme von Ca^{2+} -Ionen wird durch die Sr-Modifikation reduziert.
- Die Beimischung von SrCO_3 vermindert, eine Substitution von CaCO_3 durch SrCO_3 dagegen erhöht die Druckfestigkeit der Zemente.
- Insbesondere S-Typ-Zemente zeigen eine kontrollierte, über längere Zeit konstante Sr^{2+} -Freisetzung in wässriger Umgebung (z. B. Zellkulturmedium), die unter typischen *in vitro*-Bedingungen in Strontium-Konzentrationen von 0,025–0,010 mM resultiert.
- Die freigesetzten Sr-Konzentrationen liegen innerhalb der *in vitro* auf osteoblastäre Zellen stimulierend, auf osteoklastäre Zellen inhibierend wirkenden Bereiche.
- Proliferation und osteogene Differenzierung humaner mesenchymaler Stammzellen sind insbesondere auf S-Typ-Zementen gegenüber dem Sr-freien Zement erhöht. Dies kann sowohl auf die ionische Interaktion der Zemente mit dem Zellkulturmedium (Sr^{2+} -Freisetzung, Ca^{2+} -Aufnahme, Änderung des pH-Werts) als

auch auf die direkte Zell-Material-Interaktion (Oberflächenbeschaffenheit, Zelladhäsion) zurückgeführt werden.

- Die Osteoklastogenese ist auf S-Typ-Zementen gegenüber unmodifiziertem CPC vermindert, ebenso nimmt die osteoklastäre Resorption der S-Typ-Zemente mit zunehmendem Sr-Gehalt ab.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Eignung der hier entwickelten Strontium-Zemente für die Versorgung osteoporotischer Knochendefekte aus materialwissenschaftlicher Sicht sowie anhand von *in vitro*-Experimenten gezeigt. Darüber hinaus konnte im Rahmen einer ersten Kleintierstudie, in der der Zement S100 in einem metaphysären Defektmodell in osteoporotischen Ratten untersucht wurde¹, ein positiver Einfluss der aus dem Zement freigesetzten Sr^{2+} -Ionen auf die Knochenneubildung gezeigt werden (vgl. Kap. 5) [136,141–143]. Der nächste Schritt hin zur klinischen Anwendung des neuartigen Knochenzements besteht in der Testung im Rahmen eines geeigneten Großtiermodells, wobei sich aus anatomischen Gründen ein *ovines* Modell – bestenfalls an Tieren mit osteoporotischem Knochenstatus – empfiehlt. Eine entsprechende Studie ist im Rahmen des Sonderforschungsbereichs/Transregio 79, in dem auch die hier behandelten Arbeiten stattfanden, geplant. Anhand der gezeigten Ergebnisse erscheint gerade der Zement S100 als geeignet für die Versorgung von Knochendefekten, insbesondere bei Osteoporose-Patienten.

Ein wichtiger Aspekt der klinischen Anwendung von Knochenzementen ist deren einfache Applizierbarkeit, gerade aufgrund der zunehmenden Bedeutung minimalinvasiver Operationstechniken. Zwar ist es prinzipiell möglich, die aus Pulver und Flüssigkeit angerührte Zementpaste mittels Spritze und Kanüle in einen Knochendefekt zu applizieren, jedoch wird dies zum einen durch die begrenzte Verarbeitungszeit des Zements und zum anderen durch Druck-bedingte Entmischungsvorgänge in der Spritze, dem sog. *filter pressing*, erschwert [144]. Eine Lösung dieses Problems bieten sog. Pasten-Zemente, in denen das Zementpulver in einem nicht-wässrigen Medium dispergiert vorliegt und eine auch durch Kanülen gut dosierbare Paste bildet. Erst bei Kontakt mit wässrigem Medium – beispielsweise Blut oder Gewebsflüssigkeit – startet die hydraulische Ab-

¹Kooperationsstudie im Rahmen des SFB Transregio 79, durchgeführt im Labor für Experimentelle Unfallchirurgie der Justus-Liebig-Universität Gießen.

bindereaktion. Eine solche Paste wurde von der Firma InnoTERE GmbH auf Basis des hier verwendeten *biocement 1.0* (CPC) entwickelt [145]. Es bleibt zu Untersuchen, ob sich die in der vorliegenden Arbeit entwickelte Strontium-Modifizierung, insbesondere vom S-Typ, auf solche Pastenzemente übertragen lässt und ob dadurch ebenfalls eine Erhöhung der mechanischen Festigkeit sowie vergleichbar günstige biologische Effekte auf Zellkulturebene wie auch *in vivo* erreicht werden können.

7 Literaturverzeichnis

- [1] NATIONAL OSTEOPOROSIS FOUNDATION: *Clinician's Guide to Prevention and Treatment of Osteoporosis*. National Osteoporosis Foundation., Washington DC, 2010.
- [2] CONSENSUS DEVELOPMENT CONFERENCE: *Prophylaxis and treatment of osteoporosis*. Am J Med, 90:107–10, 1991.
- [3] HÄUSSLER, B., H. GOTHE, D. GÖL, G. GLAESKE, L. PIENTKA und D. FELSENBURG: *Epidemiology, treatment and costs of osteoporosis in Germany – the BoneEVA Study*. Osteoporos Int, 18(1):77–84, 2007.
- [4] ROBERT KOCH INSTITUT: *Beiträge zur Gesundheitsberichterstattung des Bundes; Daten und Fakten: Ergebnisse der Studie »Gesundheit in Deutschland aktuell 2010«*. Robert Koch-Institut, Berlin, 2012.
- [5] DVO: *Leitlinie 2009 zur Prophylaxe, Diagnostik und Therapie der Osteoporose bei Erwachsenen*. Osteologie, 18(4):304–28, 2009.
- [6] RECKER, R. R. und L. ARMAS: *The effect of antiresorptives on bone quality*. Clin Orthop Relat Res, 469(8):2207–14, 2011.
- [7] MARIE, P. J.: *Strontium as therapy for osteoporosis*. Curr Opin Pharmacol, 5(6):633–36, 2005.
- [8] GINEBRA, M. P., T. TRAYKOVA und J. A. PLANELL: *Calcium phosphate cements: competitive drug carriers for the musculoskeletal system?* Biomaterials, 27(10):2171–7, 2006.
- [9] LUHMANN, T., O. GERMERSHAUS, J. GROLL und L. MEINEL: *Bone targeting for the treatment of osteoporosis*. J Control Release, 161(2):198–213, 2012.
- [10] RACHNER, T. D., S. KHOSLA und L. C. HOFBAUER: *Osteoporosis: now and the future*. Lancet, 377:1276–87, 2011.

- [11] FELSENBURG, D.: *Struktur und Funktion des Knochens - Stützwerk aus Kollagen und Hydroxylapatit*. Pharmazie in unserer Zeit, 30(6):488–94, 2001.
- [12] CONFAVREUX, C. B.: *Bone: from a reservoir of minerals to a regulator of energy metabolism*. Kidney Int, 79(121):S14–S19, 2011.
- [13] BOSKEY, A. L.: *Dynamics of Bone and Cartilage Metabolism (Second Edition)*, Kapitel 12: Mineralization, Structure and Function of Bone., Seiten 201–12. Burlington: Academic Press, 2006.
- [14] HING, K. A.: *Bone repair in the twenty-first century: biology, chemistry or engineering?* Philos Transact A Math Phys Eng Sci, 362(1825):2821–50, 2004.
- [15] KULAR, J., J. TICKNER, S. M. CHIM und J. XU: *An overview of the regulation of bone remodelling at the cellular level*. Clin Biochem, 45(12):863–73, 2012.
- [16] MATSUO, K. und N. IRIE: *Osteoclast-osteoblast communication*. Arch Biochem Biophys, 473(2):201–9, 2008.
- [17] SAFADI, F. F., M. F. BARBE, S. M. ABDELMAGID, M. C. RICO, R. A. ASWAD, J. LITVIN und S. N. POPOFF: *Bone Structure, Development and Bone Biology: Bone Pathology*. Humana Press, 2009.
- [18] KIKUTA, J. und M. ISHII: *Osteoclast migration, differentiation and function: novel therapeutic targets for rheumatic diseases*. Rheumatology, 52(2):226–34, 2013.
- [19] BOYLE, W. J., W. S. SIMONET und D. L. LACEY: *Osteoclast differentiation and activation*. Nature, 423(6937):337–42, 2003.
- [20] BROWN, E. M. und R. J. MACLEOD: *Extracellular calcium sensing and extracellular calcium signaling*. Physiol Rev, 81(1):239–97, 2001.
- [21] LIU, Y. K., Q. Z. LU, R. PEI, H. J. JI, G. S. ZHOU, X. L. ZHAO, R. K. TANG und M. ZHANG: *The effect of extracellular calcium and inorganic phosphate on the growth and osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells in vitro: implication for bone tissue engineering*. Biomed Mater, 4(2):025004, 2009.
- [22] YAMAUCHI, M., T. YAMAGUCHI, H. KAJI, T. SUGIMOTO und K. CHIHARA: *Involvement of calcium-sensing receptor in osteoblastic differentiation of mouse MC3T3-E1 cells*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 288(3):E608–16, 2005.
- [23] BARRADAS, A. M. C., H. A. M. FERNANDES, N. GROEN, Y. C. CHAI, J. SCHROOTEN, J. VAN DE PEPPEL, J. S. VAN LEEUWEN, C. A. VAN BLITTERS-

-
- WIJK und J. DE BOER: *A calcium-induced signaling cascade leading to osteogenic differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stromal cells*. *Biomaterials*, 33(11):3205–15, 2012.
- [24] BECK, J und GEORGE R: *Inorganic phosphate as a signaling molecule in osteoblast differentiation*. *J Cell Biochem*, 90(2):234–43, 2003.
- [25] MICHIGAMI, T.: *Extracellular phosphate as a signaling molecule*. *Contrib Nephrol*, 180:14–24, 2013.
- [26] BONEWALD, L. F.: *The amazing osteocyte*. *J Bone Miner Res*, 26(2):229–38, 2011.
- [27] CHAI, Y. C., A. CARLIER, J. BOLANDER, S. J. ROBERTS, L. GERIS, J. SCHROOTEN, H. VAN OOSTERWYCK und F. P. LUYTEN: *Current views on calcium phosphate osteogenicity and the translation into effective bone regeneration strategies*. *Acta Biomater*, 8(11):3876–87, 2012.
- [28] AASETH, J., G. BOIVIN und O. ANDERSEN: *Osteoporosis and trace elements—an overview*. *J Trace Elem Med Biol*, 26(2-3):149–52, 2012.
- [29] ROSEN, C. J.: *Age-related Osteoporosis and Skeletal Markers of Bone Turnover*. In: MARKUS J. SEIBEL, SIMON P. ROBINS, JOHN P. BILEZIKIAN (Herausgeber): *Dynamics of Bone and Cartilage Metabolism: Principles and Clinical Applications*, Seiten 671–87, San Diego, 2006. Academic Press.
- [30] LICATA, A. A.: *Bone density, bone quality, and FRAX: changing concepts in osteoporosis management*. *Am J Obstet Gynecol*, 208(2):92–96, 2013.
- [31] LIPPUNER, K.: *The future of osteoporosis treatment - a research update*. *Swiss Med Wkly*, 142:w13624, 2012.
- [32] REID, I. R.: *Anti-resorptive therapies for osteoporosis*. *Semin Cell Dev Biol*, 19(5):473–8, 2008.
- [33] RUSSELL, R. G. G., N. B. WATTS, F. H. EBETINO und M. J. ROGERS: *Mechanisms of action of bisphosphonates: similarities and differences and their potential influence on clinical efficacy*. *Osteoporos Int*, 19(6):733–759, 2008.
- [34] NG, K. W.: *Potential role of odanacatib in the treatment of osteoporosis*. *Clin Interv Aging*, 7:235–47, 2012.
- [35] TSOURDI, E., T. D. RACHNER, M. RAUNER, C. HAMANN und L. C. HOFBAUER: *Denosumab for bone diseases: translating bone biology into targeted therapy*. *Eur J*

- Endocrinol, 165(6):833–40, 2011.
- [36] NELSON, E. R., S. E. WARDELL und D. P. McDONNELL: *The molecular mechanisms underlying the pharmacological actions of estrogens, SERMs and oxysterols: implications for the treatment and prevention of osteoporosis*. Bone, 53(1):42–50, 2013.
- [37] MARIE, P. J.: *Strontium ranelate: New insights into its dual mode of action*. Bone, 40(5,S1):S5–S8, 2007.
- [38] ESBRIT, P. und M. J. ALCARAZ: *Current perspectives on parathyroid hormone (PTH) and PTH-related protein (PTHrP) as bone anabolic therapies*. Biochem Pharmacol, 85(10):1417–23, 2013.
- [39] KE, H. Z., W. G. RICHARDS, X. LI und M. S. OMINSKY: *Sclerostin and Dickkopf-1 as therapeutic targets in bone diseases*. Endocr Rev, 33(5):747–83, 2012.
- [40] BRONNER, F.: *Kap. 25 - Metals in Bone: Aluminum, Boron, Cadmium, Chromium, Lanthanum, Lead, Silicon, and Strontium*. In: BILEZIKIAN, JOHN P., LAWRENCE G. RAISZ und T. JOHN MARTIN (Herausgeber): *Principles of Bone Biology*, Seiten 515–31. Academic Press, San Diego, 3. Auflage, 2008.
- [41] NIELSEN, P. S.: *The biological role of strontium*. Bone, 35(3):583–8, 2004.
- [42] BOSE, S., G. FIELDING, S. TARAFDER und A. BANDYOPADHYAY: *Understanding of dopant-induced osteogenesis and angiogenesis in calcium phosphate ceramics*. Trends Biotechnol, 31(10):594–605, 2013.
- [43] HUHEEY, J. E., E. A. KEITER, R. L. KEITER und R. STREUDEL: *Anorganische Chemie / Prinzipien von Struktur und Reaktivität*. de Gruyter, Berlin [u.a.], 3. Auflage, 2003.
- [44] SHORR, E. und A. C. CARTER: *The usefulness of strontium as an adjuvant to calcium in the remineralization of the skeleton in man*. Bull Hosp Joint Dis, 13(1):59–66, 1952.
- [45] MOROHASHI, T., T. SANO, K. HARAI und S. YAMADA: *Effects of strontium on calcium metabolism in rats. II. Strontium prevents the increased rate of bone turnover in ovariectomized rats*. Jpn J Pharmacol, 68(2):153–9, 1995.
- [46] REGINSTER, J. Y., E. SEEMAN, M. C. DE VERNEJOU, S. ADAMI, J. COMPSTON, C. PHENEKOS, J. P. DEVOGELAER, M. DIAZ CUIEL, A. SAWICKI, S. GOEMAE-RE, O. H. SORESENSEN, D. FELSEBERG und P. J. MEUNIER: *Strontium ranelate reduces the risk of nonvertebral fractures in postmenopausal women with osteoporosis*.

-
- sis: *Treatment of Peripheral Osteoporosis (TROPOS) study*. J Clin Endocrinol Metab, 90(5):2816–22, 2005.
- [47] MEUNIER, P. J., C. ROUX, S. ORTOLANI, M. DIAZ-CURIEL, J. COMPSTON, P. MARQUIS, C. CORMIER, G. ISAIA, J. BADURSKI, J. D. WARK, J. COLLETTE und J. Y. REGINSTER: *Effects of long-term strontium ranelate treatment on vertebral fracture risk in postmenopausal women with osteoporosis*. Osteoporos Int, 20(10):1663–73, 2009.
- [48] CANALIS, E., M. HOTT, P. DELOFFRE, Y. TSOUDEROS und P. J. MARIE: *The divalent strontium salt S12911 enhances bone cell replication and bone formation in vitro*. Bone, 18(6):517–23, 1996.
- [49] VERBERCKMOES, S. C., M. E. DE BROE und P. C. D’HAESE: *Dose-dependent effects of strontium on osteoblast function and mineralization*. Kidney Int, 64(2):534–43, 2003.
- [50] YANG, F., D. YANG, J. TU, Q. ZHENG, L. CAI und L. WANG: *Strontium enhances osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells and in vivo bone formation by activating Wnt/catenin signaling*. Stem Cells, 29(6):981–91, 2011.
- [51] CHOUDHARY, S., P. HALBOUT, C. ALANDER, L. RAISZ und C. PILBEAM: *Strontium ranelate promotes osteoblastic differentiation and mineralization of murine bone marrow stromal cells: involvement of prostaglandins*. J Bone Miner Res, 22(7):1002–10, 2007.
- [52] MARIE, P. J.: *The calcium-sensing receptor in bone cells: a potential therapeutic target in osteoporosis*. Bone, 46(3):571–76, 2010.
- [53] CHATTOPADHYAY, N., S. J. QUINN, O. KIFOR, C. YE und E. M. BROWN: *The calcium-sensing receptor (CaR) is involved in strontium ranelate-induced osteoblast proliferation*. Biochem Pharmacol, 74(3):438–447, 2007.
- [54] HURTEL-LEMAIRE, A. S., R. MENTAVERRI, A. CAUDRILLIER, F. COURNARIE, A. WATTEL, S. KAMEL, E. F. TERWILLIGER, E. M. BROWN und M. BRAZIER: *The calcium-sensing receptor is involved in strontium ranelate-induced osteoclast apoptosis. New insights into the associated signaling pathways*. J Biol Chem, 284(1):575–84, 2009.
- [55] BAKKER, A. D., B. ZANDIEH-DOULABI und J. KLEIN-NULEND: *Strontium Ranelate affects signaling from mechanically-stimulated osteocytes towards osteoclasts and*

- osteoblasts. *Bone*, 53(1):112–9, 2013.
- [56] PENG, S., X. S. LIU, S. HUANG, Z. LI, H. PAN, W. ZHEN, K. D. K. LUK, X. E. GUO und W. W. LU: *The cross-talk between osteoclasts and osteoblasts in response to strontium treatment: involvement of osteoprotegerin*. *Bone*, 49(6):1290–8, 2011.
- [57] GIANNOUDIS, P. V., H. DINOPOULOS und E. TSIRIDIS: *Bone substitutes: an update*. *Injury*, 36(3):S20–S27, 2005.
- [58] WINTERMANTEL, E. und S.-W. HA: *Medizintechnik mit biokompatiblen Werkstoffen und Verfahren.*, Band 3. Berlin; Heidelberg [u.a.]: Springer, 2002.
- [59] BOHNER, M. und J. LEMAITRE: *Can bioactivity be tested in vitro with SBF solution?* *Biomaterials*, 30(12):2175–9, 2009.
- [60] DAMIEN, C. J. und J. R. PARSONS: *Bone graft and bone graft substitutes: a review of current technology and applications*. *J Appl Biomater*, 2(3):187–208, 1991.
- [61] WALKER, J., S. SHADANBAZ, T. B. F. WOODFIELD, M. P. STAIGER und G. J. DIAS: *Magnesium biomaterials for orthopedic application: A review from a biological perspective*. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, Seiten 000–000, 2014.
- [62] DOROZHKIN, S. V.: *Calcium Orthophosphates as Bioceramics: State of the Art*. *J Funct Biomater*, 1(1):22–107, 2010.
- [63] HUM, J. und A. R. BOCCACCINI: *Bioactive glasses as carriers for bioactive molecules and therapeutic drugs: a review*. *J Mater Sci Mater Med*, 23:2317–33, 2012.
- [64] DOROZHKIN, S. V. und M. EPPL: *Die biologische und medizinische Bedeutung von Calciumphosphaten*. *Angew Chem*, 114:3260–77, 2002.
- [65] LEGEROS, R. Z.: *Calcium phosphate-based osteoinductive materials*. *Chem Rev*, 108(11):4742–53, 2008.
- [66] WEN, H. B., F. Z. CUI, Q. L. FENG, H. D. LI und X. D. ZHU: *Microstructural investigation of the early external callus after diaphyseal fractures of human long bone*. *J Struct Biol*, 114(2):115–22, 1995.
- [67] ROUFOSSE, A. H., W. J. LANDIS, W. K. SABINE und M. J. GLIMCHER: *Identification of brushite in newly deposited bone mineral from embryonic chicks*. *J Ultrastruct Res*, 68(3):235–55, 1979.
- [68] SAMAVEDI, S., A. R. WHITTINGTON und A. S. GOLDSTEIN: *Calcium phosphate ceramics in bone tissue engineering: A review of properties and their influence on cell*

-
- behavior. *Acta Biomater*, 9:9037–45, 2013.
- [69] HING, K. A.: *Bioceramic bone graft substitutes: influence of porosity and chemistry*. *Int J Appl Ceram Technol*, 2(3):184–99, 2005.
- [70] DOROZHKIN, S. V.: *Calcium orthophosphates: occurrence, properties, biomineralization, pathological calcification and biomimetic applications*. *Biomatter*, 1(2):121–64, 2011.
- [71] CHOW, L. C.: *Next generation calcium phosphate-based biomaterials*. *Dent Mater J*, 28(1):1–10, 2009.
- [72] AIA, M. A., J. E. MATHERS und R. W. MOONEY: *Thermodynamic solubility products of α - and β -SrHPO₄ from 25° to 90°C*. *J. Chem. Eng. Data*, 9(3):335–8, 1964.
- [73] DEAN, J.A. und N.A. LANGE: *Lange's handbook of chemistry*. McGraw-Hill, 1992.
- [74] PATNAIK, P.: *Handbook of Inorganic Chemicals*. McGraw-Hill Handbooks, 2002.
- [75] MANDEL, S. und A. C. TAS: *Brushite (CaHPO₄·2H₂O) to octacalcium phosphate (Ca₈(HPO₄)₂(PO₄)₄·5H₂O) transformation in DMEM solutions at 36.5°C*. *Mater Sci Eng C*, 30(2):245–54, 2010.
- [76] BOHNER, M.: *Calcium orthophosphates in medicine: from ceramics to calcium phosphate cements*. *Injury*, 31(S4):37–47, 2000.
- [77] DOROZHKIN, S. V.: *Self-Setting Calcium Orthophosphate Formulations: Cements, Concretes, Pastes and Putties*. *International Journal of Materials and Chemistry*, 1(1):1–48, 2011.
- [78] DRIESSENS, F. C. M., E. A. P. DE MAEYER, E. FERNANDEZ, M. G. BOLTONG, G. BERGER, R. M. H. VERBEECK, M. P. GINEBRA und J. A. PLANELL: *Amorphous calcium phosphate cements and their transformation into calcium deficient hydroxyapatite*. In: *Bioceramics*, Band 9, Seiten 231–234, 1996.
- [79] GUO, D., K. XU, X. ZHAO und Y. HAN: *Development of a strontium-containing hydroxyapatite bone cement*. *Biomaterials*, 26(19):4073–83, 2005.
- [80] WANG, X. und J. YE: *Variation of crystal structure of hydroxyapatite in calcium phosphate cement by the substitution of strontium ions*. *J Mater Sci Mater Med*, 19(3):1183–6, 2008.
- [81] WANG, X., J. YE und Y. WANG: *Influence of a novel radiopacifier on the properties of an injectable calcium phosphate cement*. *Acta Biomater*, 3(5):757–63, 2007.
- [82] YU, TAO, JIANDONG YE und YINGJUN WANG: *Preparation and characterization*

- of a novel strontium-containing calcium phosphate cement with the two-step hydration process.* Acta Biomater, 5(7):2717–27, 2009.
- [83] ROMIEU, G., X. GARRIC, S. MUNIER, M. VERT und P. BOUDEVILLE: *Calcium-strontium mixed phosphate as novel injectable and radio-opaque hydraulic cement.* Acta Biomater, 6(8):3208–15, 2010.
- [84] TADIER, S., R. BAREILLE, R. SIADOUS, O. MARSAN, C. CHARVILLAT, S. CAZALBOU, J. AMÉDÉE, C. REY und C. COMBES: *Strontium-loaded mineral bone cements as sustained release systems: Compositions, release properties, and effects on human osteoprogenitor cells.* J Biomed Mater Res B, 100B:378–90, 2011.
- [85] SAINT-JEAN, S. JEGOU, C. L. CAMIRE, P. NEVSTEN, S. HANSEN und M. P. GINEBRA: *Study of the reactivity and in vitro bioactivity of Sr-substituted alpha-TCP cements.* J Mater Sci Mater Med, 16(11):993–1001, 2005.
- [86] ALKHRAISAT, M. H., C. MOSEKE, JEREZ B. L., J. E. BARRALET, E. LOPEZ-CARBACOS und U. GBURECK: *Strontium modified biocements with zero order release kinetics.* Biomaterials, 29(35):4691–7, 2008.
- [87] PINA, S., P. M. TORRES, F. GOETZ-NEUNHOEFFER, J. NEUBAUER und J. M. F. FERREIRA: *Newly developed Sr-substituted alpha-TCP bone cements.* Acta Biomater, 6(3):928–35, 2010.
- [88] ALKHRAISAT, M. H., MARINO T. F., RETAMA R. C., JEREZ B. L. und E. LOPEZ-CABARCOS: *Combined effect of strontium and pyrophosphate on the properties of brushite cements.* Acta Biomater, 4(3):664–70, 2008.
- [89] ENGSTRAND, J., J. JACOB, H. ENGQVIST und C. PERSSON: *Optimization of an acidic calcium phosphate cement with enhanced radiopacity.* In: *The 23rd Interdisciplinary Research Conference on Injectable Osteoarticular Biomaterials and Bone Augmentation Procedures - GRIBOI: Proceedings*, 2013.
- [90] FUJIHARA, E., M. KON und K. ASAOKA: *Strontium-Substituted Calcium Phosphate Cements Prepared with Strontium-Containing Solutions.* Key Eng Mater, 330–2:795–8, 2007.
- [91] LEROUX, L., M. FRÈCHE und J.L. LACOUT: *Calcium Phosphate Cement to Prepare Sr-Containing Biomaterials.* Key Eng Mat, 192–5:235–238, 2001.
- [92] WONG, C. T., W. W. LU, W. K. CHAN, K M C. CHEUNG, K D K. LUK, D. S. LU,

-
- A B M. RABIE, L. F. DENG und J C Y. LEONG: *In vivo cancellous bone remodeling on a strontium-containing hydroxyapatite (sr-HA) bioactive cement*. J Biomed Mater Res A, 68(3):513–521, 2004.
- [93] NI, G. X., W. W. LU, B. XU, K. Y. CHIU, C. YANG, Z. Y. LI, W. M. LAM und K. D. K. LUK: *Interfacial behaviour of strontium-containing hydroxyapatite cement with cancellous and cortical bone*. Biomaterials, 27(29):5127–33, 2006.
- [94] O'BRIEN, D., D. BOYD, S. MADIGAN und S. MURPHY: *Evaluation of a novel radiopacifying agent on the physical properties of surgical spineplex*. J Mater Sci Mater Med, 21(1):53–58, 2010.
- [95] PANZAVOLTA, S., P. TORRICELLI, L. STURBA, B. BRACCI, R. GIARDINO und A. BIGI: *Setting properties and in vitro bioactivity of strontium-enriched gelatin-calcium phosphate bone cements*. J Biomed Mater Res A, 84(4):965–72, 2008.
- [96] VATER, C., A. LODE, A. BERNHARDT, A. REINSTORF, C. HEINEMANN und M. GELINSKY: *Influence of different modifications of a calcium phosphate bone cement on adhesion, proliferation, and osteogenic differentiation of human bone marrow stromal cells*. J Biomed Mater Res A, 92(4):1452–60, 2010.
- [97] REINSTORF, A., U. HEMPEL, F. OLGEMÖLLER, H. DOMASCHKE, W. SCHNEIDERS, R. MAI, B. STADLINGER, A. RÖSEN-WOLFF, S. RAMMELT, M. GELINSKY und W. POMPE: *O-phospho-L-serine modified calcium phosphate cements - material properties, in vitro and in vivo investigations*. Mat-wiss u Werkstofftech, 37(6):491–503, 2006.
- [98] BÖRGER, A., P. SUPANCIC und R. DANZER: *The ball on three balls test for strength testing of brittle discs: stress distribution in the disc*. J Eur Cer Soc, 22(9–10):1425–36, 2002.
- [99] BÖRGER, A., P. SUPANCIC und R. DANZER: *The ball on three balls test for strength testing of brittle discs: Part II: analysis of possible errors in the strength determination*. J Eur Cer Soc, 24(10–11):2917–28, 2004.
- [100] WHITE, W. N. und P. SETHU: *Automated microfluidic blood lysis protocol for enrichment of circulating nucleated cells*. J Vis Exp, 34, 2009.
- [101] PROMEGA: *CytoTox 96[®] Non-Radioactive Cytotoxicity Assay*, 2012.
- [102] LIAN, J. B. und G. S. STEIN: *Development of the osteoblast phenotype: molecular*

- mechanisms mediating osteoblast growth and differentiation.* Iowa Orthop J, 15:118–40, 1995.
- [103] VÄÄNÄNEN, H. K., H. ZHAO, M. MULARI und J. M. HALLEEN: *The cell biology of osteoclast function.* J Cell Sci, 113 (Pt 3):377–81, 2000.
- [104] KHAIROUN, I., M. G. BOLTONG, F. C. DRIESSENS und J. A. PLANELL: *Effect of calcium carbonate on the compliance of an apatitic calcium phosphate bone cement.* Biomaterials, 18(23):1535–9, 1997.
- [105] GINEBRA, M. P., C. CANAL, M. ESPANOL, D. PASTORINO und E. B. MONTU-FAR: *Calcium phosphate cements as drug delivery materials.* Adv Drug Deliv Rev, 64(12):1090–110, 2012.
- [106] GINEBRA, M. P., E. FERNÁNDEZ, F. C. M. DRIESSENS, M. G. BOLTONG, J. MUNTASELL, J. FONT und J. A. PLANELL: *The effects of temperature on the behaviour of an apatitic calcium phosphate cement.* J Mater Sci Mater Med, 6(12):857–60, 1995.
- [107] DRIESSENS, F. C., J. A. PLANELL, M. G. BOLTONG, I. KHAIROUN und M. P. GINEBRA: *Osteotransductive bone cements.* Proc Inst Mech Eng H, 212(6):427–35, 1998.
- [108] ANTONAKOS, A., E. LIAROKAPIS und T. LEVENTOURI: *Micro-Raman and FTIR studies of synthetic and natural apatites.* Biomaterials, 28(19):3043–54, 2007.
- [109] QIAN, W.-Y., D.-M. SUN, R.-R. ZHU, X.-L. DU, H. LIU und S.-L. WANG: *pH-sensitive strontium carbonate nanoparticles as new anticancer vehicles for controlled etoposide release.* Int J Nanomedicine, 7:5781–92, 2012.
- [110] BIGI, A., E. BOANINI, C. CAPUCCINI und M. GAZZANO: *Strontium-substituted hydroxyapatite nanocrystals.* Inorganica Chimica Acta, 360(3):1009–16, 2007.
- [111] DOROZHKIN, S. V.: *Calcium Orthophosphate Cements and Concretes.* Materials, 2:221–91, 2009 2009.
- [112] ARNETT, T. R.: *Extracellular pH regulates bone cell function.* J Nutr, 138(2):S415–18, 2008.
- [113] GUSTAVSSON, J., M. P. GINEBRA, E. ENGEL und J. PLANELL: *Ion reactivity of calcium-deficient hydroxyapatite in standard cell culture media.* Acta Biomater, 7(12):4242–52, 2011.

-
- [114] CHRISTOFFERSEN, J., M. R. CHRISTOFFERSEN und N. KJAERGAARD: *The kinetics of dissolution of calcium hydroxyapatite in water at constant pH*. Journal of Crystal Growth, 43(4):501–11, 1978.
- [115] SHEPHERD, J. H., D. V. SHEPHERD und S. M. BEST: *Substituted hydroxyapatites for bone repair*. J Mater Sci Mater Med, 23(10):2335–47, Mar 2012.
- [116] BARRÈRE, F., C. A. VAN BLITTERSWIJK und K. DE GROOT: *Bone regeneration: molecular and cellular interactions with calcium phosphate ceramics*. Int J Nanomedicine, 1(3):317–32, 2006.
- [117] ROHNKE, M., A. HENSS, J. KOKESCH-HIMMELREICH, M. SCHUMACHER, S. RAY, V. ALT, M. GELINSKY und J. JANEK: *Mass spectrometric monitoring of Sr-enriched bone cements-from in vitro to in vivo*. Anal Bioanal Chem, 405(27):8769–80, 2013.
- [118] SCHUMACHER, M., A. HENSS, M. ROHNKE und M. GELINSKY: *A novel and easy to prepare strontium(II) modified calcium phosphate bone cement with enhanced mechanical properties*. Acta Biomaterialia, 9:7536–44, 2013.
- [119] CURRAN, D. J., T. J. FLEMING, M. R. TOWLER und S. HAMPSHIRE: *Mechanical parameters of strontium doped hydroxyapatite sintered using microwave and conventional methods*. J Mech Behav Biomed Mater, 4(6):2063–73, 2011.
- [120] CATTANI-LORENTE, M., R. RIZZOLI und P. AMMANN: *In vitro bone exposure to strontium improves bone material level properties*. Acta Biomater, 9(6):7005–13, 2013.
- [121] LU, J., J. WEI, Y. YAN, H. LI, J. JIA, S. WEI, H. GUO, T. XIAO und C. LIU: *Preparation and preliminary cytocompatibility of magnesium doped apatite cement with degradability for bone regeneration*. J Mater Sci Mater Med, 22(3):607–15, 2011.
- [122] BRAUX, J., F. VELARD, C. GUILLAUME, S. BOUTHORS, E. JALLOT, J.-M. NEDELEC, D. LAURENT-MAQUIN und P. LAQUERRIERE: *A new insight into the dissociating effect of strontium on bone resorption and formation*. Acta Biomater, 7(6):2593–603, 2011.
- [123] BARBARA, A., P. DELANNOY, B. G. DENIS und P. J. MARIE: *Normal matrix mineralization induced by strontium ranelate in MC3T3-E1 osteogenic cells*. Metabolism, 53(4):532–7, 2004.
- [124] CAVERZASIO, J.: *Strontium ranelate promotes osteoblastic cell replication through at*

- least two different mechanisms.* Bone, 42(6):1131–6, 2008.
- [125] XUE, W., J. L. MOORE, H. L. HOSICK, S. BOSE, A. BANDYOPADHYAY, W. W. LU, K. M. C. CHEUNG und K. D. K. LUK: *Osteoprecursor cell response to strontium-containing hydroxyapatite ceramics.* J Biomed Mater Res A, 79(4):804–14, 2006.
- [126] DOYLE, A. und J.B. GRIFFITHS: *Cell and tissue culture for medical research.* Wiley, 2000.
- [127] TADIER, S., N. LE BOLAY, C. REY und C. COMBES: *Co-grinding significance for calcium carbonate-calcium phosphate mixed cement. Part I: effect of particle size and mixing on solid phase reactivity.* Acta Biomater, 7(4):1817–26, 2011.
- [128] BONNELYE, E., A. CHABADEL, F. SALTEL und P. JURDIC: *Dual effect of strontium ranelate: stimulation of osteoblast differentiation and inhibition of osteoclast formation and resorption in vitro.* Bone, 42(1):129–38, 2008.
- [129] CAUDRILLIER, A., A.-S. HURTEL-LEMAIRE, A. WATTEL, F. COURNARIE, C. GODIN, L. PETIT, J.-P. PETIT, E. TERWILLIGER, S. KAMEL, E. M. BROWN, R. MENTAVERRI und M. BRAZIER: *Strontium ranelate decreases receptor activator of nuclear factor- κ B ligand-induced osteoclastic differentiation in vitro: involvement of the calcium-sensing receptor.* Mol Pharmacol, 78(4):569–76, 2010.
- [130] BARON, R. und Y. TSOUDEROS: *In vitro effects of S12911-2 on osteoclast function and bone marrow macrophage differentiation.* Eur J Pharmacol, 450(1):11–7, 2002.
- [131] COSTA, D. O., P. D. H. PROWSE, T. CHRONES, S. M. SIMS, D. W. HAMILTON, RIZKALLA A. S. und S. J. DIXON: *The differential regulation of osteoblast and osteoclast activity by surface topography of hydroxyapatite coatings.* Biomaterials, 34(30):7215–26, 2013.
- [132] CAPUCCINI, C., P. TORRICELLI, E. BOANINI, M. GAZZANO, R. GIARDINO und A. BIGI: *Interaction of Sr-doped hydroxyapatite nanocrystals with osteoclast and osteoblast-like cells.* J Biomed Mater Res A, 89(3):594–600, 2009.
- [133] SCHILLING, A. F., W. LINHART, S. FILKE, M. GEBAUER, T. SCHINKE, J. M. RUEGER und M. AMLING: *Resorbability of bone substitute biomaterials by human osteoclasts.* Biomaterials, 25(18):3963–72, 2004.
- [134] GROSSARDT, C., A. EWALD, L. M. GROVER, J. E. BARRALET und U. GBURECK: *Passive and active in vitro resorption of calcium and magnesium phosphate cements by*

-
- osteoclastic cells*. *Tissue Eng Part A*, 16(12):3687–95, 2010.
- [135] YANG, L., S. PEREZ-AMODIO, F. Y F. BARRÈRE-DE GROOT, V. EVERTS, C. A. VAN BLITTERSWIJK und P. HABIBOVIC: *The effects of inorganic additives to calcium phosphate on in vitro behavior of osteoblasts and osteoclasts*. *Biomaterials*, 31(11):2976–89, 2010.
- [136] THORMANN, U., S. RAY, U. SOMMER, T. EL KHASSAWNA, T. A. REHLING, M. HUNDGEBURTH, A. HENSS, M. ROHNKE, J. JANEK, K. S. LIPS, C. HEISS, G. SCHLEWITZ, G. SZALAY, MATTHIAS SCHUMACHER, M. GELINSKY, R. SCHNETTLER und V. ALT: *Bone formation induced by strontium modified calcium phosphate cement in critical-size metaphyseal fracture defects in ovariectomized rats*. *Biomaterials*, 34(34):8589–98, 2013.
- [137] ALT, V., U. THORMANN, S. RAY, D. ZAHNER, L. DÜRSELEN, K. LIPS, T. EL KHASSAWNA, C. HEISS, A. RIEDRICH, G. SCHLEWITZ, A. IGNATIUS, M. KAMPSCHULTE, H. VON DEWITZ, S. HEINEMANN, R. SCHNETTLER und A. LANGHEINRICH: *A new metaphyseal bone defect model in osteoporotic rats to study biomaterials for the enhancement of bone healing in osteoporotic fractures*. *Acta Biomater*, 9(6):7035–42, 2013.
- [138] KOKESCH-HIMMELREICH, J., M. SCHUMACHER, M. ROHNKE, M. GELINSKY und J. JANEK: *ToF-SIMS analysis of osteoblast-like cells and their mineralized extracellular matrix on strontium enriched bone cements*. *Biointerphases*, 8(1):17, 2013.
- [139] BOONRUNGSIMAN, S., E. GENTLEMAN, R. CARZANIGA, N. D. EVANS, D. W. MCCOMB, A. E. PORTER und M. M. STEVENS: *The role of intracellular calcium phosphate in osteoblast-mediated bone apatite formation*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 109(35):14170–5, 2012.
- [140] CARTER, D. R. und W. C. HAYES: *The compressive behavior of bone as a two-phase porous structure*. *J Bone Joint Surg Am*, 59(7):954–62, 1977.
- [141] CHENG, CAIXIA, VOLKER ALT, LEYUN PAN, ULRICH THORMANN, REINHARD SCHNETTLER, LUDWIG G. STRAUSS, M. SCHUMACHER, M. GELINSKY und ANTONIA DIMITRAKOPOULOU-STAUS: *Preliminary evaluation of different biomaterials for defect healing in an experimental osteoporotic rat model with dynamic PET-CT (dPET-CT) using F-18-sodium fluoride (NaF)*. *Injury*, 45(3):501–505, 2014.

- [142] LIPS, K. S., V. KAUSCHKE, S. HARTMANN, U. THORMANN, S. RAY, M. KAMP-SCHULTE, A. LANGHEINRICH, M. SCHUMACHER, M. GELINSKY, S. HEINEMANN, T. HANKE, A. R. KAUTZ, M. SCHNABELRAUCH, R. SCHNETTLER, C. HEISS, V. ALT und O. KILIAN: *Podoplanin Immunopositive Lymphatic Vessels at the Implant Interface in a Rat Model of Osteoporotic Fractures*. PLoS ONE, 8(10):e77259, 2013.
- [143] LIPS, K. S., V. KAUSCHKE, S. HARTMANN, U. THORMANN, S. RAY, V. ALT, M. SCHUMACHER, M. GELINSKY, S. HEINEMANN, T. HANKE, A. KAUTZ, M. SCHNABELRAUCH, G. SZALAY, C. HEISS, R. SCHNETTLER und O. KILIAN: *Presence of cholinergic nerve fibers in an osteoporotic fracture model Running Head: Cholinergic nerves in osteoporotic fractures*. Journal of Muskuloskeletal and Neuronal Interactions, Im Druck, 2014.
- [144] BOHNER, M. und G. BAROUD: *Injectability of calcium phosphate pastes*. Biomaterials, 26(13):1553–63, 2005.
- [145] HEINEMANN, S., S. RÖSSLER, M. LEMM, M. RUHNOW und B. NIES: *Properties of injectable ready-to-use calcium phosphate cement based on water-immiscible liquid*. Acta Biomater, 9(4):6199–207, 2013.

8 Eigene Publikationen und Mitautorschaften

8.1 Zeitschriftenbeiträge

LIPS, K. S., V. KAUSCHKE, S. HARTMANN, U. THORMANN, S. RAY, V. ALT, **M. SCHUMACHER**, M. GELINSKY, S. HEINEMANN, T. HANKE, A. R. KAUTZ, M. SCHNABELRAUCH, G. SZALAY, C. HEISS, R. SCHNETTLER UND O. KILIAN: *Cholinergic nerve fibers in bone defects of a rat osteoporosis model and their regulation by implantation of bone substitution materials*. J Musculoskel Neuron Int 2014 (akzeptiert).

CHENG, C., V. ALT, L. PAN, U. THORMANN, R. SCHNETTLER, L. G. STRAUSS, **M. SCHUMACHER**, M. GELINSKY, A. DIMITRAKOPOULOU-STAUSS: *Preliminary evaluation of different biomaterials for defect healing in an experimental osteoporotic rat model with dynamic PET-CT (dPET-CT) using F-18-Sodium Fluoride (NaF)*. Injury,45:501–5, 2014.

LIPS, K. S., V. KAUSCHKE, S. HARTMANN, U. THORMANN, S. RAY, M. KAMP-SCHULTE, A. LANGHEINRICH, **M. SCHUMACHER**, M. GELINSKY, S. HEINEMANN, T. HANKE, A. R. KAUTZ, M. SCHNABELRAUCH, R. SCHNETTLER, C. HEISS, V. ALT UND O. KILIAN: *Podoplanin immunopositive lymphatic vessels at the implant interface in a rat model of osteoporotic fractures*. PLoS One,8:e77259, 2013.

M. ROHNKE, A. HENSS, J. KOKESCH-HIMMELREICH, **M. SCHUMACHER**, S. RAY, V. ALT, M. GELINSKY UND J. JANEK: *Mass spectrometric monitoring of Sr-enriched bone cements—from in vitro to in vivo*. Anal Bioanal Chem,405:8769–80, 2013.

SCHUMACHER, M., A. LODE, A. HELTH UND M. GELINSKY: *A novel strontium(II)-modified calcium phosphate bone cement stimulates hMSC proliferation and osteogenic differentiation in vitro*. Acta Biomater,9:9547–57, 2013.

THORMANN, U., S. RAY, U. SOMMER, T. EL KHASSAWNA, T. REHLING, M. HUND-GEURTH, A. HENSS, M. ROHNKE, J. JANEK, K. S. LIPS, C. HEISS, G. SCHLEWITZ, G. SZALAY, **M. SCHUMACHER**, M. GELINSKY, R. SCHNETTLER UND V. ALT: *Strontium modified calcium phosphate cement (SrCPC) enhances bone formation in critical-size metaphyseal fracture defects in ovariectomized rats*. Biomaterials,34:8589–98, 2013.

KOKESCH-HIMMELREICH, J., **M. SCHUMACHER**, M. GELINSKY, M. ROHNKE UND J. JANEK: *Investigation of osteoblast-like cells and their mineralized ECM on strontium enriched bone cements using ToF-SIMS*. Biointerphases,8:17, 2013.

SCHUMACHER, M., A. HENSS, M. ROHNKE UND M. GELINSKY: *A novel and easy to prepare strontium(II) modified calcium phosphate bone cement with enhanced mechanical properties*. Acta Biomater,9:7536–44, 2013.

SCHUMACHER, M., F. UHL, R. DETSCH, U. DEISINGER UND G. ZIEGLER: *Static and dynamic cultivation of bone marrow stromal cells on biphasic calcium phosphate scaffolds derived from an indirect rapid prototyping technique*. J Mater Sci Mater Med,21:3039–48, 2010.

SCHUMACHER, M., U. DEISINGER, R. DETSCH UND G. ZIEGLER: *Indirect rapid prototyping of biphasic calcium phosphate scaffolds as bone substitutes: influence of phase composition, macroporosity and pore geometry on mechanical properties*. J Mater Sci Mater Med,21:3119-27, 2010.

DEISINGER, U., S. HAMISCH, **M. SCHUMACHER**, F. UHL, R. DETSCH UND G. ZIEGLER: *Fabrication of Tailored Hydroxyapatite Scaffolds: Comparison between a Direct and an Indirect Rapid Prototyping Technique*. Key Eng Mat,361–363:915–8, 2007.

8.2 Tagungsbeiträge

SCHUMACHER, M., K. BAE, T. J. KIM, H. S. KIM, UND M. GELINSKY: *Osteogenesis on SrCPC under reduced gravity conditions*. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Biomaterialien, Erlangen (26.09.2013–28.09.2013). BioNanoMaterials 14:43, 2013.

ALT, V., U. THORMANN, S. RAY, T. EL KHASSAWNA, U. SOMMER, T. REHLING, M. ROHNKE, A. HENSS, **M. SCHUMACHER**, M. GELINSKY, C. HEISS UND R. SCHNETTLER: *Strontium-modifizierter Calcium-Phosphat-Zement (SrCPC) verbessert die Knochenneubildung in einem metaphysären critical-size Defekt im Vergleich zu Strontium-freien Calcium-Phosphat-Zement (CPC)*. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Biomaterialien, Erlangen (26.09.2013–28.09.2013). BioNanoMaterials 14:155, 2013.

LIPS, K. S., V. KAUSCHKE, M. GRUHN, M. KAMPSCHULTE, A. LANGHEINRICH, S. RAY, U. THORMANN, P. GOVINDARAJAN, S. HEINEMANN, T. HANKE, **M. SCHUMACHER**, M. GELINSKY, C. HEISS, V. ALT, R. SCHNETTLER UND O. KILIAN: *Einfluss des Neurotrophins BDNF auf die Integration von Knochenersatzmaterialien*. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Biomaterialien, Erlangen (26.09.2013–28.09.2013). BioNanoMaterials 14:97, 2013.

KOKESCH-HIMMELREICH, J., **M. SCHUMACHER**, M. ROHNKE, M. GELINSKY UND J. JANEK: *Investigation of osteoblast-like cells on strontium enriched bone cements using ToF-SIMS*. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Biomaterialien, Erlangen (26.09.2013–28.09.2013). BioNanoMaterials 14:95, 2013.

SCHUMACHER, M., A. BERNHARDT UND M. GELINSKY: *Einfluss Strontium-modifizierter Calciumphosphat-Knochenzemente auf die Osteoclastogenese.* Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Biomaterialien, Hamburg (01.11.2013–03.11.2013). *BioNanoMaterials* 13:162, 2012.

LOHMANN, T., I. PANZER, M. SCHUMACHER, K. TRINKAUS, O. KILIAN, R. SCHNETTLER, M. GELINSKY, M. UND LIPS, K. S.: *Strontium-modifiziertes Calciumphosphatzement steigert die Biokompatibilität und reguliert die Expression des Neurotrophins BDNF.* Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Biomaterialien, Hamburg (01.11.2013–03.11.2013). *BioNanoMaterials* 13:145, 2012.

WILCZEK, S., I. PANZER, M. SCHUMACHER, S. KNAACK, V. KAUSCHKE, M. MADZHAROVA, O. KILIAN, R. SCHNETTLER, M. GELINSKY, UND LIPS, K. S.: *In-vitro Untersuchungen zum Differenzierungsverhalten von mesenchymalen Stammzellen in aktive Osteoblasten nach Zugabe von knochenersatzmaterialien und Pharmaka.* Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Biomaterialien, Hamburg (01.11.2013–03.11.2013). *BioNanoMaterials* 13:147, 2012.

SCHUMACHER, M., A. LODE, A. HENSS, A. HELTH UND M. GELINSKY: *A novel and easy to prepare strontium-substituted calcium phosphate bone cement for improved healing of osteoporotic bone defects.* 1st International Conference on Materials in Medicine, Faenza, Italy (08.10.2013–11.10.2013).

SCHUMACHER, M., A. LODE UND M. GELINSKY: *Strontium-haltige Knochenzemente für die lokale Behandlung osteoporotischer Knochendefekte.* Deutscher Kongress für Orthopädie und Unfallchirurgie, Berlin (23.10.2013–26.10.2013).

SCHUMACHER, M., A. LODE, A. HENSS, M. ROHNKE, B. NIES UND M. GELINSKY: *Strontianite modified calcium phosphate bone cements.* 9th World Biomaterials Congress, Chengdu, China (01.06.2013–05.06.2012).

SCHUMACHER, M., C. STRIEGLER, D. APPELHANS UND M. GELINSKY: *Oligosaccharide-functionalized poly(ethylene imine) nanoparticles as drug carriers in calcium phosphate bone cements.* Materials Science and Engineering Conference 2012, Darmstadt (25.09.2012–27.09.2012).

SCHUMACHER M., A. LODE, UND M. GELINSKY: *Strontium-releasing CaP bone cements for osteoporotic bone defects.* Annual Meeting of the Scandinavian Society for Biomaterials, Uppsala, Sweden (08.05.2012–09.05.2012). *Eur Cell Mater* 23(2):60, 2012.

SCHUMACHER, M., A. LODE, A. HENSS, M. ROHNKE, B. NIES, J. JANEK UND M. GELINSKY: *Strontium doped calcium phosphate bone cements for systemically impaired bone.* Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Biomaterialien, Gießen (10.11.2011–12.11.2011). *BioNanoMaterials* 12:201, 2011.

PANZER, I., T. LOHMANN, M. MADZHSROVA, S. WILCZEK, K. TRINKAUS, **M. SCHUMACHER**, M. GELINSKY, R. SCHNETTLER, O. KILIAN UND K. S. LIPS: *Neurotrophin BDNF stimuliert die Proliferation von Osteoblasten-Progenitoren und die knöcherne Integration von Calciumphosphat-Zement in vitro*. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Biomaterialien, Gießen (10.11.2011–12.11.2011) BioNanoMaterials 12:74, 2011.

SCHUMACHER, M., B. NIES UND M. GELINSKY: *Strontium/Calcium phosphate bone cements for systemically impaired bone*. 5th CRTD Summer Conference on Regenerative Medicine 2011, Dresden (24.06.2011).

DOUARD, N., R. DETSCH, R. CHOTARD-GHODSNIA, C. DAMIA, **M. SCHUMACHER**, F. UHL, U. DEISINGER UND E. CHAMPION: *Elaboration and in vitro biological evaluation of silicated β -Tricalcium Phosphate (Si_x - β -TCP) for bone substitution*. ECERS - 11th International Conference and Exhibition of the European Ceramic Society, Krakow, Poland (21.6.2009–26.6.2009).

SCHUMACHER, M., U. DEISINGER, R. DETSCH UND G. ZIEGLER: *Indirektes Rapid Prototyping biphasischer Calciumphosphat-Keramiken: biomechanische und zellbiologische Eigenschaften*. 17. Symposium Verbundwerkstoffe und Werkstoffverbunde, DGM, Bayreuth (1.4.2009–3.4.2009) W. Krenkel: Verbundwerkstoffe und Werkstoffverbunde, Wiley-VCH, Bayreuth, 669-675, 2009.

DEISINGER U., F. UHL, R. DETSCH, **M. SCHUMACHER**, S. HAMISCH, O. KÜSTER UND G. ZIEGLER: *Eigenschaften unterschiedlicher Rapid Prototyping-Scaffolds im Hinblick auf das Bone Tissue Engineering*. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Biomaterialien, Hamburg (20.11.2008–22.11.2008) BIOmaterialien 9(3):109, 2008.

UHL, F., R. DETSCH, **M. SCHUMACHER**, U. DEISINGER UND G. ZIEGLER: *Bone Tissue Engineering mit biphasischen über Rapid Prototyping hergestellten Calciumphosphat-Scaffolds*. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Biomaterialien, Hamburg (20.11.2008–22.11.2008). BIOmaterialien 9(3):87, 2008.

DEISINGER U., O. KÜSTER, **M. SCHUMACHER** UND G. ZIEGLER: *3D-Drucken von patientenindividuellen Knochenimplantaten*. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Biomaterialien, Hamburg (20.11.2008–22.11.2008). BIOmaterialien 9(3):109, 2008.

DEISINGER, U., F. UHL, R. DETSCH, **M. SCHUMACHER**, S. HAMISCH, O. KÜSTER UND G. ZIEGLER: *Eigenschaften unterschiedlicher Rapid Prototyping-Scaffolds im Hinblick auf das Bone Tissue Engineering*. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Biomaterialien, Hamburg (20.11.2008–22.11.2008). BIOmaterialien 9(3):121, 2008.

DEISINGER, U., **M. SCHUMACHER**, R. DETSCH UND G. ZIEGLER: *Tailoring the Structure of Bone Substitute Materials by an Indirect Rapid Prototyping Technique*. IWAC03, Limoges, France (06.11.2008–08.11.2008).

DEISINGER U., S. HAMISCH, **M. SCHUMACHER**, F. UHL, R. DETSCH UND G. ZIEGLER: *Fabrication of Tailored Hydroxyapatite Scaffolds: Comparison between a Direct and an Indirect Rapid Prototyping Technique*. Bioceramics 20, Nantes (24.10.2007–26.10.2007).

DEISINGER U., **M. SCHUMACHER**, S. HAMISCH, F. UHL, R. DETSCH UND G. ZIEGLER: *Solid Freeform Fabrication von Calciumphosphaten: Vergleich eines direkten mit einem indirekten Verfahren*. Arbeitskreis Biokeramik, Berlin (26.4.2007).

9 Danksagung

Mein Dank gilt Prof. Dr. Jürgen Eckert für seine Bereitschaft, die Betreuung dieser Arbeit zu übernehmen.

Prof. Dr. Michael Gelinsky danke ich herzlich für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und die Möglichkeit, diese Arbeit am *Translationalen Zentrum für Knochen-, Gelenk- und Weichgewebeforschung* anzufertigen. Mit stets für Diskussionen offenem Ohr und vielen guten Ratschlägen hatte er ganz wesentlichen Anteil am Gelingen dieser Arbeit. Nicht nur durch die Einbettung dieser Arbeit in den Transregio 79, sondern auch durch die Chance zur Teilnahme an zahlreichen wissenschaftlichen Veranstaltungen und die Ermöglichung eines Forschungsaufenthalts an der Yonsei Universität in Wonju, Südkorea, hat er mir wertvolle Erfahrungen in der interdisziplinären Arbeit ermöglicht, wofür ich sehr dankbar bin.

Frau Dr. Anja Lode und Frau Dr. Anne Bernhardt danke ich dafür, dass sie ihren reichen Erfahrungsschatz in der zellbiologischen Arbeit mit mir geteilt und mir in vielen Diskussionen wichtige Hilfestellung gegeben haben.

Diese Arbeit entstand im Rahmen des von der Deutschen Forschungsgemeinschaft geförderten Sonderforschungsbereichs Transregio 79. In diesem interdisziplinären Projekt durfte ich mit zahlreichen Kollegen aus unterschiedlichsten wissenschaftlichen Fachgebieten zusammenarbeiten und viele anregende Gespräche führen, die alle aufzuzählen an dieser Stelle nicht möglich ist. Namentlich danken möchte ich wegen der besonders engen Zusammenarbeit Dr. Marcus Rohnke, Dr. Anja Henß und Julia Kokesch-Himmelreich, mit denen eine tolle Kooperation während der ToF-SIMS Analytik entstand, Dr. Elena Rosseeva, von der ich viel über die Röntgenanalytik lernen konnte,

sowie Arne Helth und Andrea Voß für die Hilfe bei der Oberflächen- und Freisetzungsanalytik.

Ortrud Zieschang und Sophie Brüggemeier danke ich für die Unterstützung bei der Herstellung zahlloser Zementproben und den biologischen Arbeiten. Meinen Mitdoktoranden danke ich für die gute Laune im Labor, die die Zeit wie im Flug vergehen ließ, und wünsche Ihnen viel Erfolg für ihre eigenen Arbeiten. Anja Stößer, deren Diplomarbeit ich begleiten durfte, danke ich außerdem für ihre gewissenhafte Arbeit, die wertvolle Grundlagen zu dieser Arbeit beigetragen hat. Ihnen und allen Mitarbeitern des Zentrums gehört weiterhin mein Dank für die tolle Zusammenarbeit.

Ich danke außerdem Dr. Berthold Nies und der InnoTERE GmbH für die Kooperation bei der Herstellung der Zement-Precursormischungen und für die *biocement 1.0*-Proben.

Zuletzt gilt mein herzlicher Dank meiner Frau und meiner Familie, die mir den Rücken gestärkt und mich während der Arbeit an meiner Dissertation immer unterstützt haben.

10 Selbstständigkeitserklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts habe ich keine Unterstützungsleistungen von in dieser Arbeit nicht genannten Personen erhalten. Insbesondere habe ich nicht die Hilfe eines kommerziellen Promotionsberaters in Anspruch genommen. Dritte haben von mir keine geldwerten Leistungen für Arbeiten erhalten, die in Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt und ist auch noch nicht veröffentlicht worden.

Ich erkenne die Promotionsordnung der Fakultät Maschinenwesen der Technischen Universität Dresden in ihrer aktuellen Version an.

Dresden, den 20. Mai 2014

Matthias Schumacher

A Anhang

A.1 Daten zur Materialcharakterisierung

Oberflächencharakterisierung

Tabelle A.1 zeigt die Ergebnisse der Rauheitsmessung mittels Weißlicht-Interferometrie an CPC und Sr-modifizierten Zementen zu unterschiedlichen Zeitpunkten. Deutlich zu

Tab. A.1: Rauheitswerte für frisch hergestellte, 4 d ausgehärtete sowie für 7 Tage in Zellkulturmedium ausgelagerte Zemente.

Material	Rauheit R_a [μm]		
	frisch	4 d ATM	7 d Medium
CPC	$0,6015 \pm 0,0261$	$0,4833 \pm 0,1218$	$0,6900 \pm 0,0938$
A5	$0,4807 \pm 0,0418$	$0,4170 \pm 0,0332$	$0,4843 \pm 0,0489$
A10	$0,6370 \pm 0,1832$	$0,5150 \pm 0,0589$	$0,5516 \pm 0,0752$
S50	$0,3597 \pm 0,0685$	$0,4047 \pm 0,1877$	$0,2287 \pm 0,0626$
S100	$0,4497 \pm 0,1428$	$0,1296 \pm 0,0747$	$0,3587 \pm 0,0544$

Material	Rauheit R_q [μm]		
	frisch	4 d ATM	7 d Medium
CPC	$0,8820 \pm 0,1159$	$0,8087 \pm 0,1637$	$1,1680 \pm 0,1165$
A5	$0,7243 \pm 0,0847$	$0,6123 \pm 0,0552$	$1,0677 \pm 0,4862$
A10	$1,0013 \pm 0,3457$	$0,7790 \pm 0,050$	$0,8680 \pm 0,2402$
S50	$0,8426 \pm 0,3651$	$0,6053 \pm 0,1166$	$0,4323 \pm 0,2482$
S100	$0,5777 \pm 0,1530$	$0,9443 \pm 0,0201$	$0,5137 \pm 0,1138$

erkennen ist, dass S-Typ-Zemente eine geringere Rauheit als CPC und A-Typ-Zemente besitzen. Weiterhin wird die Abnahme der Rauheit während der Auslagerung in feuch-

ter Atmosphäre (ATM) sowie in Zellkulturmedium deutlich, bedingt durch die fortschreitende, einzelne Körner überbrückende Kristallitbildung an der Zementoberfläche.

Dies wird auch in Abbildung A.1 deutlich: auf REM-Aufnahmen hoher Vergrößerung (hier 10 000 x) ist das fortschreitende Zusammenwachsen der Zement-Precursorpartikel während der Auslagerung sowie die Apatit-Kristallitbildung erkennbar. Diese führt insbesondere bei S-Typ-Zementen zu einer weitgehenden Homogenisierung der Oberfläche.

Charakterisierung des Bulkmaterials

Die Cluster-artige Verteilung des beigemischten SrCO_3 in A-Typ-Zementen konnte auch mittels EDX nachgewiesen werden: gut zu erkennen sind Sr-Konzentrationen in A5 und A10 Proben (korrespondierende EDX- und REM-Aufnahmen der Zementoberfläche). Dabei sind in A10-Proben entsprechend dem höheren Gehalt an SrCO_3 mehr dieser Cluster zu erkennen. Dagegen weisen S-Typ-Zemente eine homogene Sr-Verteilung auf, ebenfalls mit höherem Sr-Gehalt ansteigend.

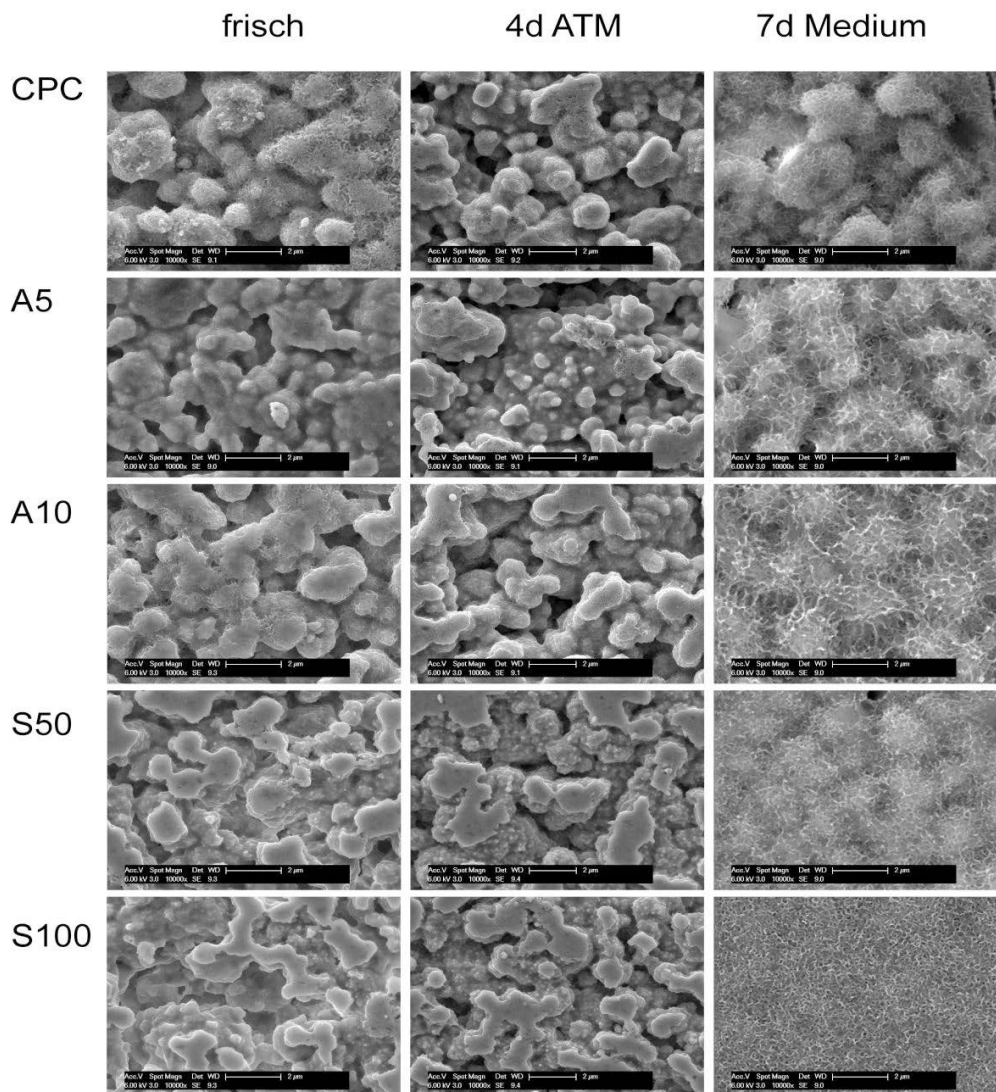


Abb. A.1: Oberfläche von CPC und A- bzw. S-Typ modifizierten Zementen nach der Herstellung (frisch) sowie nach 4-tägigem Aushärten (4d ATM) bzw. 7-tägiger Auslagerung in Zellkulturmedium (Maßbalken: 2 µm).

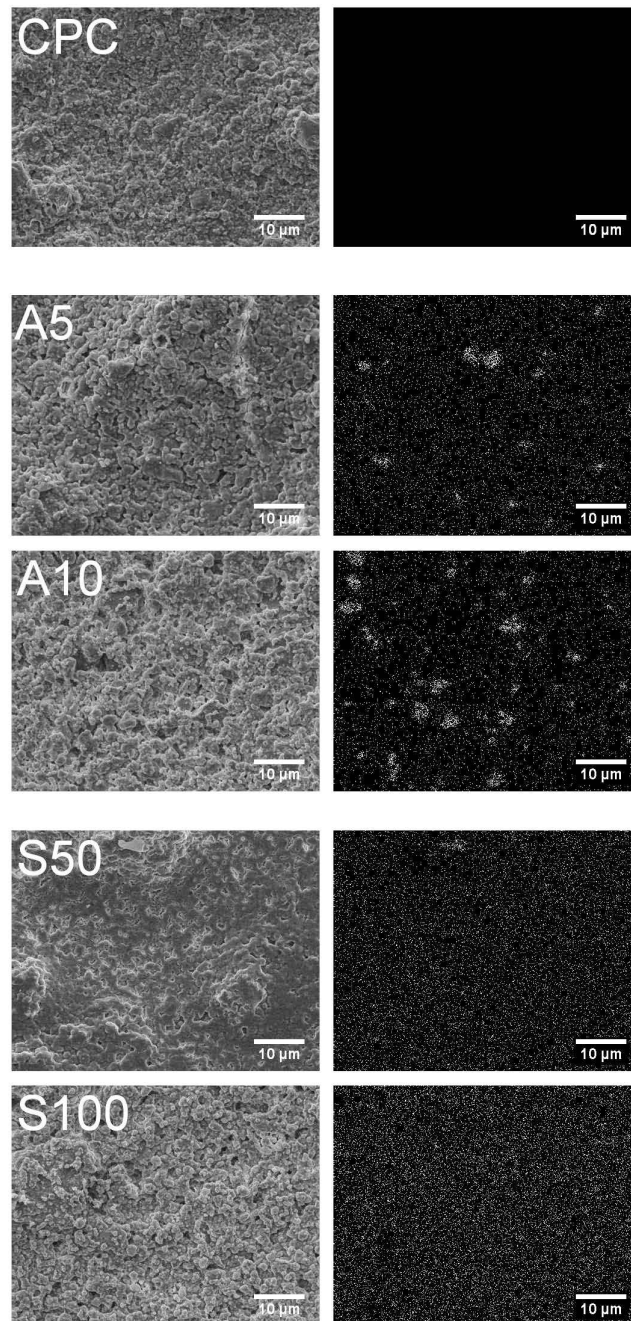


Abb. A.2: REM und EDX-Aufnahmen 4 Tage in feuchter Atmosphäre gehärteter CPC, A- und S-Typ-Zemente.

A.2 Ergänzende Daten zur Charakterisierung *in vitro*

Vergleich der Methoden zur Zellzahlbestimmung

Aufgrund der bekannten hohen Bindungskapazität von Calciumphosphatverbindungen für Nucleinsäuren wurden die beiden Methoden zur Zellzahlbestimmung, Ermittlung des DNA-Gehalts sowie Quantifizierung der Aktivität der intrazellulären LDH, in einem Wiederfindungs-Experiment verglichen. Dazu wurde eine definierte Menge Zelllysat für 50 min (entsprechend der Lysezeit für Zellen auf Zementen) auf CPC und Sr-modifizierten Zementen inkubiert, anschließend der DNA- und LDH-Gehalt ermittelt und mit auf Polystyrol (keine bekannten Wechselwirkungen mit DNA oder Enzymen) inkubiertem Lysat verglichen. Abbildung A.3 macht deutlich, dass die Zellzahlbestimmung mittels DNA-Quantifizierung anfällig gegenüber dem jeweiligen Substratmaterial ist: auf CPC wurde eine deutlich geringere DNA-Menge als auf PS sowie den anderen Zementen gemessen (alle Messwerte wurden auf PS bezogen).

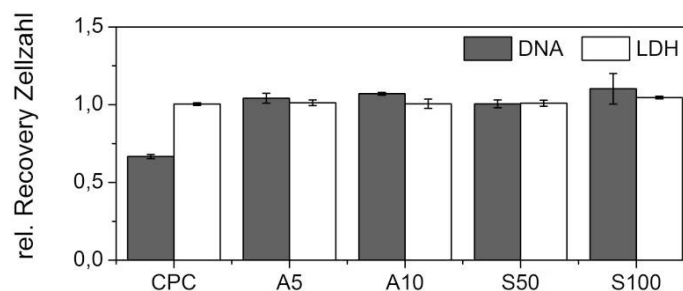


Abb. A.3: Im Rahmen eines Wiederfindungsexperiments ermittelter Vergleich der mittels DNA-Quantifizierung sowie Bestimmung der intrazellulären LDH-Aktivität ermittelten Zellzahl auf CPC und Sr-modifizierten Zementen. Alle Messwerte wurden auf PS bezogen.

Die Bestimmung der Zellzahl mittels LDH-Aktivität hingegen lieferte auf allen Materialien mit PS vergleichbare Ergebnisse, weshalb für alle folgenden Untersuchungen zur Osteogenese die mit Hilfe der LDH-Aktivität verwendete Zellzahl verwendet wurde.

Anders im Fall der Untersuchungen zur Osteoklastogenese: hier ist eine Korrelation von LDH-Aktivität und Zellzahl nicht möglich, weshalb hier auf die DNA-Quantifizierung zurückgegriffen wurde (vgl. hierzu die in Kap. 4.3.1 angestellten Überlegungen zur Bedeutung des DNA-Gehalts in Osteoklastenkulturen).

Osteogenese

Die In Kapitel 4.2.3 gezeigten Experimente zur Osteogenese auf CPC und Sr-modifizierten Zementen wurden mit Zellen von insgesamt drei unabhängigen Spendern wiederholt. Abbildung A.4 zeigt die Ergebnisse: wie auch in Abbildung 4.21 wurde eine auf Sr-haltigen Zementen gegenüber CPC erhöhte Proliferation sowie eine gesteigerte osteogene Differenzierung (ALP-Aktivität) gefunden.

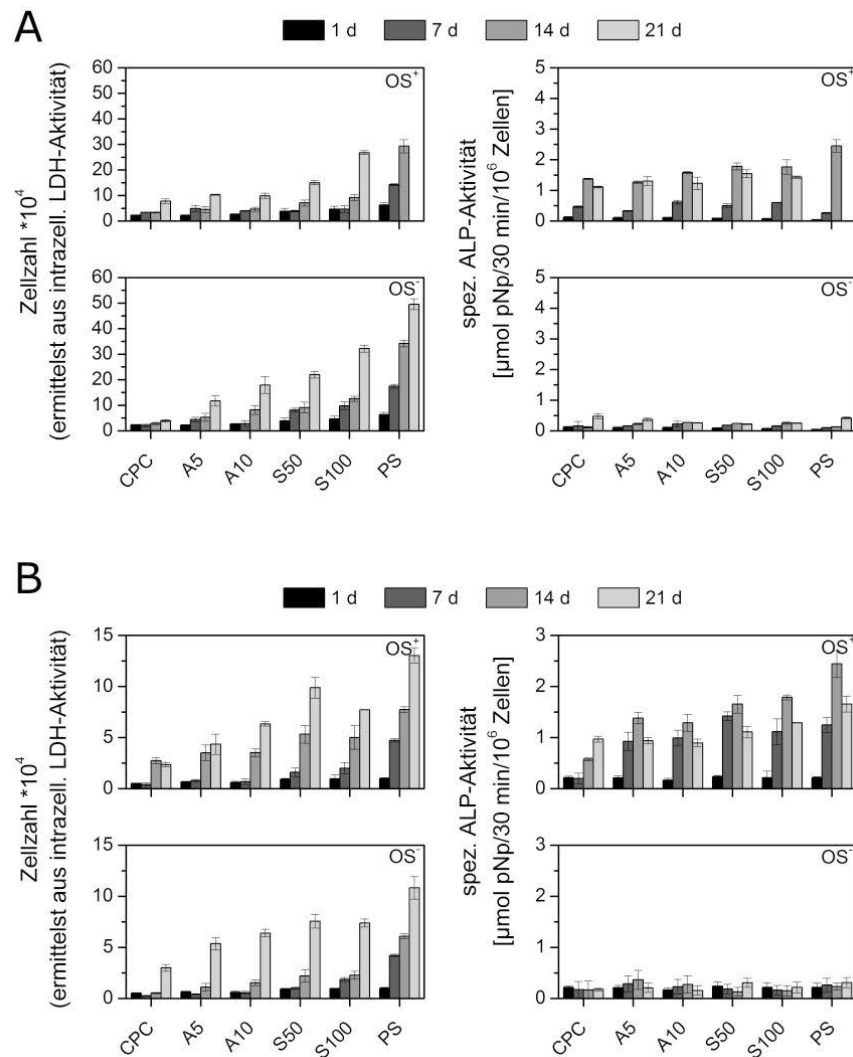


Abb. A.4: Ergebnisse der biochemischen Analyse in direkter Kultur von hMSC auf CPC und Sr-haltigen Zementen. A: Spender 41, B: Spender 315.

Ionenfreisetzung aus den Zementen während der Osteogenese

Wie in Kapitel 4.1.4 beschrieben wurden Messungen zur Sr^{2+} -Freisetzung unter *in vitro*-Bedingungen sowohl an unbesiedelten als auch an mit hMSC besiedelten Zementen durchgeführt. In Abbildung A.5 wird ersichtlich, dass in Anwesenheit der Zellen weitgehend mit den zellfreien Referenzproben vergleichbare Sr^{2+} -Konzentrationen freigesetzt wurden.

Gleiches gilt für die in den Abbildungen A.6 und A.7 dargestellten Messungen der Ca^{2+} - und Phosphat-Konzentrationen: auch hier war kein signifikanter Unterschied zwischen zellfreien und zellbesiedelten Proben zu erkennen.

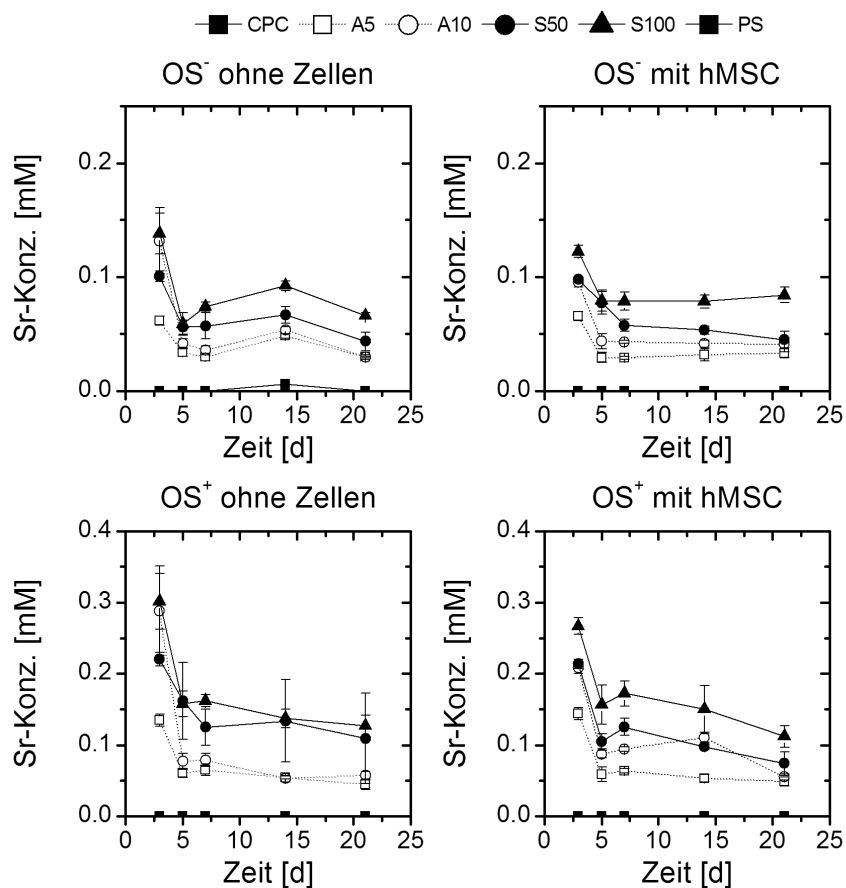


Abb. A.5: Ergebnisse der Strontium-Freisetzungsmessung *in vitro* aus unbesiedelten (links) und mit hMSC besiedelten (rechts) Zementproben.

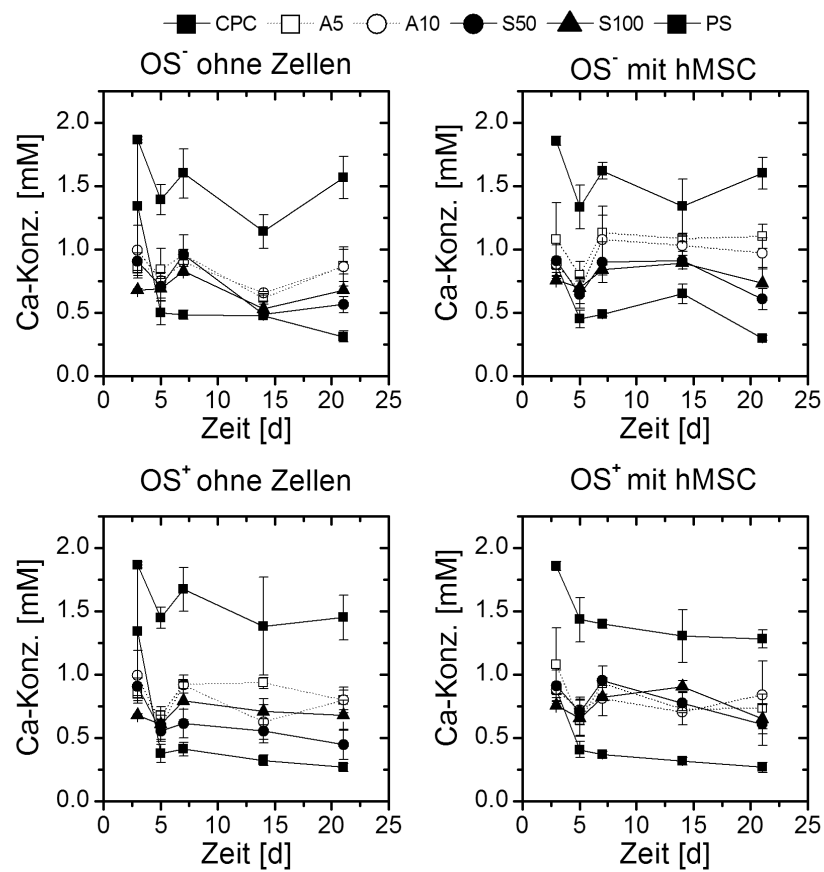


Abb. A.6: Ergebnisse der Calcium-Freisetzungsmessung *in vitro* aus unbesiedelten (links) und mit hMSC besiedelten (rechts) Zementproben.

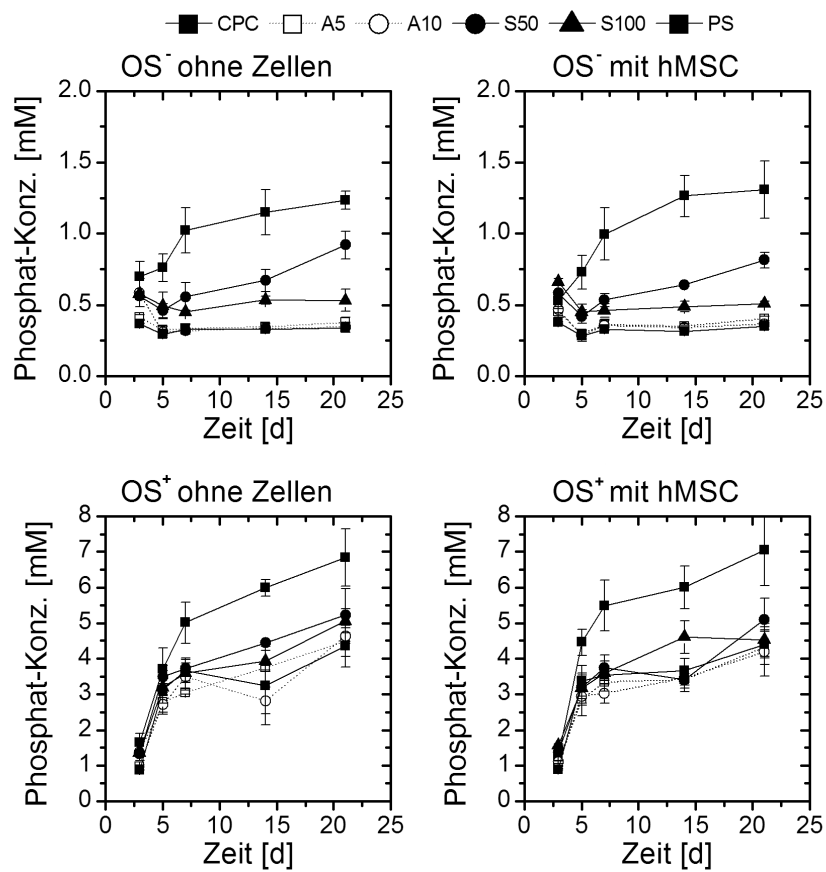


Abb. A.7: Ergebnisse der Phosphat-Freisetzungsmessung *in vitro* aus unbesiedelten (links) und mit hMSC besiedelten (rechts) Zementproben.

Zusammenfassung der Ergebnisse zur Osteogenese auf Zementen

Abbildung A.8 fasst die Ergebnisse der drei durchgeführten Experimente zur Proliferation und osteogenen Differenzierung im direkten Materialkontakt zusammen. Es wird deutlich, dass die Proliferationsraten der Zellen der drei untersuchten Spender stark voneinander abweichen. Während in einem Experiment binnen 21 Tagen die Zellzahl um den Faktor 9 zunahm erreichten Zellen eines anderen Spenders in der gleichen Zeit die beinahe 20-fache Zelldichte. Auch der Anstieg in der Aktivität der ALP war stark spenderabhängig: die Enzymaktivität nahm beispielsweise auf PS binnen 21 Tagen auf das 10- bis 70-fache zu.

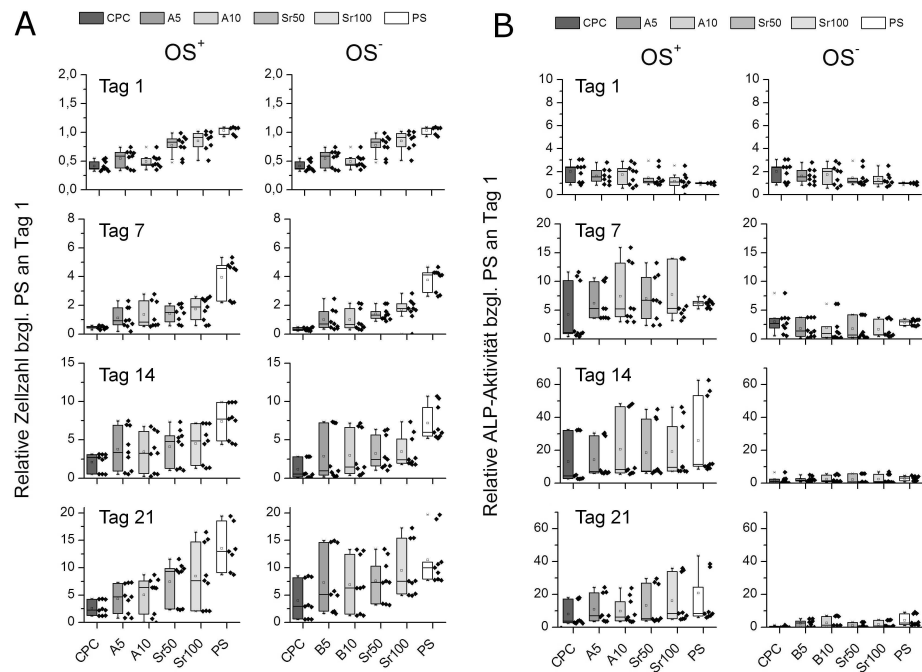


Abb. A.8: Ergebnisse der Untersuchungen zur Osteogenese mit Zellen dreier verschiedener Spender: Änderung der Zellzahl (Proliferation), ermittelt anhand der intrazellulären LDH-Konzentration (A) und osteogene Differenzierung (Aktivität der ALP, B).

Statistik

Tab. A.2: Zusammenfassung der statistischen Auswertung der Zellzahl bei Untersuchungen zur Osteogenese in direktem Materialkontakt. Statistisch signifikant zu den Zellen auf CPC abweichende Werte sind mit „+“ gekennzeichnet.

Material	Spender A			Spender B			Spender C		
	Tag 7	Tag 14	Tag 21	Tag 7	Tag 14	Tag 21	Tag 7	Tag 14	Tag 21
osteogen stimuliert (OS ⁺)									
A5	-	-	-	-	+	-	-	-	-
A10	-	-	-	-	+	+	-	-	+
S50	-	-	+	-	+	+	-	+	+
S100	+	+	+	-	+	+	+	-	+
unstimuliert (OS ⁻)									
A5	-	-	+	-	-	-	-	-	-
A10	-	-	-	-	-	+	-	+	+
S50	+	+	+	-	+	+	-	+	+
S100	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Ergänzende Angaben zur Osteoklastogenese

Wie in Kapitel 4.3.2 beschrieben wurden osteoklastogen stimulierte Zellen auf CPC und S-Typ modifizierten Zementen kultiviert und deren Morphologie mittels Fluoreszenzmikroskopie analysiert. Abbildung A.9 zeigt mittels Standardprotokoll gewonnene Osteoklasten auf CPC und S100: deutlich zu erkennen sind Osteoklasten mit Aktinring und mehreren Zellkernen, sowie eine Vielzahl einkerniger Zellen.

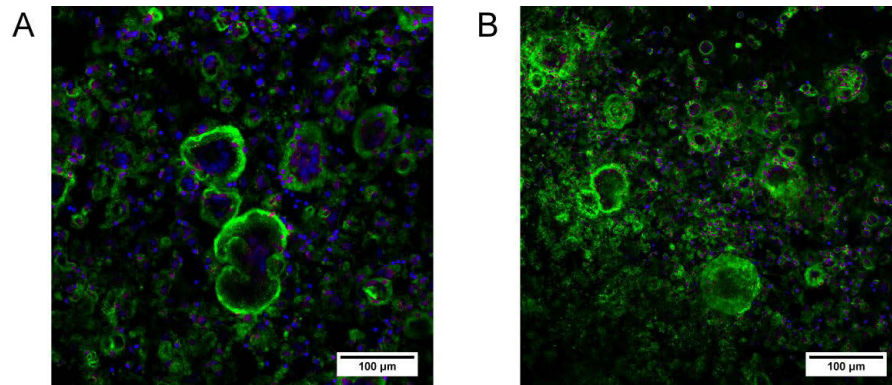


Abb. A.9: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von Osteoklasten nach 9 Tagen Kultivierung auf CPC (A) und S100 (B). Aktin- (Cytoskelett, grün) sowie DAPI-Färbung (Zellkerne, blau).